ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNÉE 1982 N° 72

LA VACCINATION ANTIBRUCELLIQUE DES BOVINS PAR VOIE CONJONCTIVALE, A L'AIDE DE LA SOUCHE BUCK 19

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
DIPLÔME D'ÉTAT

présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

Henri, Joseph DE FORNI
Né le 28 Mars 1956 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

Jury :

Président : M. ARMENGAUD
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs : M. CHANTAL
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. FERNEY
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Association des Élèves
E.N.V.T.

UNIV.
LEIDEN
1881

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547622_0013

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNEE 1982 N° 72

LA VACCINATION ANTIBRUCELLIQUE DES BOVINS PAR VOIE CONJONCTIVALE, A L'AIDE DE LA SOUCHE BUCK 19

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
DIPLÔME D'ÉTAT

présentée et soutenue publiquement en 1982
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par

Henri, Joseph DE FORNI
Né le 28 Mars 1956 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

Jury :

Président : M. ARMENGAUD
Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs : M. CHANTAL
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

M. FERNEY
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Association des Elèves
E.N.V.T.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. LAUTIE
Directeur honoraire ..... M. FLORIO
Professeurs honoraires ..... M. BRIZARD
M. SAURAT
M. GODFRAIN

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... Mme BURGAT-SACAZE
Maître assistant ..... M. PETIT

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... M. RICO
Professeur sans chaire ..... M. BRAUN
Maître-Assistant ..... M. BENARD

Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale
Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX
Maître-Assistant ..... M. LIGNEREUX
Maître-Assistant ..... M. SAUTET

Organogénèse - Tératologie
Anatomie générale - Anatomie appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE, PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... M. FARGEAS
Maître-Assistant Agrégé ..... M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie
Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique - Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître-de Conférences ..... M. EECKHOUTTE
Maître-Assistant agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie
des Denrées alimentaires d'Origine Animale
Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... M. DORCHIES
Maître de Conférences ..... M. FRANC
Maître-Assistant ..... M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Ecologie
Parasitologie externe - Dermatologie
Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... M. LESCURE
Maître de Conférences ..... M. GUELFI
Maître-Assistant ..... M. REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie-Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences ..... M. BEZILLE
Maître-Assistant ..... M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail
et des Animaux de Basse-Cour - Clinique
Consultation itinérante

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Profeseeur titulaire ..... M. CAZIEUX
Maître de Conférences ..... M. GENEVOIS
Maître-Assistant ..... M. AUTEFAGE
Maître-Assistant ..... M. FAYOLLE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale
Radiologie - Technique chirurgicale
Anesthésiologie - Pathologie chirurgicale
Traumatologie - Podologie orthopédique
Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... M. FERNEY
Professeur sans chaire ..... M. ROYAL

Pathologie de l'appareil génital et de la mamelle
Sémiologie et Propédeutique -
Pathologie de la reproduction
Obstétrique et pathologie du nouveau-né
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... M. CHANTAL
Maître-Assistant ..... M. PICAVET

Epidémiologie - Maladies Contagieuses
Zoonoses - Législation Sanitaire
Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître-Assistant ..... M. PELLERIN
Maître-Assistant ..... M. MILON

Microbiologie - Immunologie
Pathologie Générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... M. DARRE
Maître-Assistant ..... Mme. QUEINNEC

Ethnologie - Génétique animale
Extérieur - Zootechnie et Economie générales
Ethologie Appliquée, Sciences, Techniques
Economie de l'Elevage et des Productions animales
Insémination artificielle
Organisation de l'élevage

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Professeur sans chaire ..... M. GRIESS
Maître-Assistant ..... M. ENJALBERT

Botanique Appliquée et Bromatologie
Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. Les Professeurs ANGELIER, ARMENGAUD, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET et MAZENC

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A MES PARENTS

En témoignage de mon affection

A MES FRERES ET SOEURS

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur ARMENGAUD,
de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Hommage respectueux

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur CHANTAL,
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui a bien voulu s'intéresser à notre travail et nous a guidé avec bienveillance et amabilité.

Toute notre gratitude

Monsieur le Professeur FERNEY,
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a accordé l'honneur de juger notre Thèse.

Sentiments respectueux

A Monsieur FENSTERBANK

Ingénieur à l'I.N.R.A. de Tours

Dont la disponibilité et la compétence
nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nos plus vifs remerciements.

LA VACCINATION ANTIBRUCELLIQUE DES BOVINS

PAR VOIE CONJONCTIVALE

A L'AIDE DE LA SOUCHE BUCK 19

P L A N

INTRODUCTION..... p. 1

Première Partie : MISE AU POINT DE LA METHODE VACCINALE..... p. 7

A - EPREUVES SUR COBAYES..... p. 7

I. - But des manipulations..... p. 7

1. Expérience A
2. Expérience B
3. Expérience C

II. - Matériel et méthodes..... p. 9

1. Animaux
2. Préparation du vaccin et des suspensions d'épreuve
3. Protocole d'expérimentation
4. Dénombrement des *Brucella* dans la rate et les ganglions
5. Examens sérologiques

III. - Résultats..... p. 11

1. Expérience A
2. Expérience B
3. Expérience C

IV. - Discussion..... p. 18

B - DETERMINATION DE LA DOSE - EXPERIENCE SUR VACHES ADULTES..... p. 21

I. - Matériel et méthodes..... p. 21

1. Animaux et échantillons
2. Vaccin
3. Vaccination
4. Dénombrement des *Brucella* dans les ganglions
5. Titrage des anticorps vaccinaux

II. - Résultats..... p. 23

1. Réponse sérologique des vaches à l'administration de B 19 par voie conjonctivale
2. Colonisation du ganglion régional et réponses sérologiques des veaux recevant du B 19 par voie conjonctivale
3. Réponses sérologiques

III. - Discussion..... p. 27

C - EPREUVES SUR VACHES GESTANTES - SEROLOGIE ET IMMUNITE..... p. 29

I. - Buts recherchés..... p. 29

II. - Matériel et méthodes..... p. 29

1. Plan expérimental
   a) Composition des groupes pour l'étude des réponses sérologiques
   b) Composition des groupes pour la mesure de protection
2. Vaccin utilisé
3. Examen de diagnostic
   a) Sérologie
   b) Réaction allergique
   c) Résultats cliniques
   d) Examen bactériologique

III. - Résultats..... p. 34

1. Réponse sérologique après la vaccination
2. Hypersensibilité cutanée post-vaccinale
3. Mesure de protection

IV. - Discussion..... p. 40

D - COMPARAISON ENTRE DEUX METHODES DE VACCINATION..... p. 43

I. - Matériel et méthodes..... p. 43

1. Schéma expérimental
2. Examens sérologiques
3. Résultats cliniques
4. Examens bactériologiques
5. Analyses statistiques

II. - Résultats..... p. 45

1. Réponse sérologique après vaccination
2. Protection

III. - Discussion..... p. 54

Deuxième Partie : APPLICATION DE LA METHODE SUR LE TERRAIN..... p. 57

A - DOMAINE DE MARCENAT..... p. 58

I. - Composition et conduite du troupeau

II. - Historique de la Brucellose et actions sanitaires et médicales entreprises

III. - Etat vaccinal actuel des animaux

IV. - Résultats

B - DOMAINE DES RAZATS..... p. 63

I. - Composition et conduite du troupeau

II. - Historique de la Brucellose et des actions sanitaires et médicales entreprises

III. - Résultats

C - DOMAINE DE LA MINIERE..... p. 67

I. - Composition et conduite du troupeau

II. - Historique de la Brucellose et des actions sanitaires et médicales entreprises

III. - Résultats

D - DOMAINE DE LA VERRERIE..... p. 69

I. - Composition et conduite du troupeau

II. - Historique de la Brucellose et actions entreprises

III. - Résultats

IV. - Discussion

E - DOMAINE DU JOLY..... p. 72

I. - Composition et conduite du troupeau

II. - Historique de la Brucellose et actions entreprises

III. - Résultats

IV. - Discussion

F - DOMAINE DU BOIS VERNOIS..... p. 75

I. - Historique de la Brucellose et actions entreprises

II. - Résultats

Remarque générale concernant ces expérimentations sur le terrain
Résumé sérologique - Protocole vaccinal..... p. 76

Troisième Partie : INNOCUITE ET MISE EN OEUVRE DE LA METHODE..... p. 81

A - INNOCUITE DE LA METHODE - ETUDE TOXICOLOGIQUE..... p. 81

I. - Tolérance locale..... p. 81

II. - Diffusibilité..... p. 81

III. - Toxicité secondaire..... p. 83

1. Recherche des anticorps
2. Réactions allergiques
3. Réactions locales et générales

IV. - Nocivité foetale..... p. 89

B - MISE EN OEUVRE DE LA METHODE..... p. 90

I. - Définition et caractéristiques générales du vaccin..... p. 90

1. Produit
2. Nature et composition du récipient
3. Mode de voie d'administration - Posologie
4. Durée de conservation
5. Fabrication

II. - Indications..... p. 91

1. Indications générales
   a) Vaccination des génisses
   b) Vaccination des adultes
2. Indication du vaccin conjonctival en fonction de l'état d'avancement de la prophylaxie collective
   a) Zone indemne de brucellose
   b) Zones en prophylaxie

III. - Précautions d'emploi..... p. 93

CONCLUSION - CONSIDERATIONS GENERALES -
CHOIX D'UNE NOUVELLE POLITIQUE VACCINALE..... p. 95

BIBLIOGRAPHIE..... p. 101

INTRODUCTION

Actuellement, la Brucellose est en France la plus importante des maladies communes à l'homme et aux animaux, à la fois par ses effets directs sur la santé humaine et par les lourdes pertes qu'elle inflige à l'élevage et à l'économie.

Afin de lutter contre cette maladie, un plan de prophylaxie sanitaire et médicale a dû être mis en oeuvre. Il vise à obtenir par l'élimination, rapide ou différée, des animaux infectés et par la réglementation de la vaccination, un cheptel exempt en particulier d'agglutinines brucelliques, seul critère universellement admis pour que ce cheptel soit reconnu indemne de Brucellose.

Le dépistage de la Brucellose s'effectue alors de manière systématique et suivant des critères parfaitement définis (prélèvements de sang, de lait).

La vaccination, quant à elle, est strictement réglementée. Nous rappellerons ici brièvement quelles en sont les données :

- la vaccination est obligatoire pour les jeunes femelles bovines âgées de 4 à 12 mois (sauf dérogation) ;
- la vaccination est facultative et soumise à une autorisation préalable pour les femelles âgées de plus de 12 mois, sous réserve qu'elle ne soit pas susceptible de fausser le diagnostic sérologique de la maladie.

Il apparaît dès lors nécessaire de préciser quelques notions d'immunité en matière de Brucellose.

L'immunité contre la Brucellose (9) n'est liée ni à la production d'anticorps (agglutinines, anticorps fixant le complément essentiellement), ni à l'état allergique. C'est un phénomène caractérisé avant tout par une modification, probablement biochimique ou métabolique, de certaines cellules, en particulier des macrophages. Certains facteurs interviendraient dans ce processus immunologique, mais de façon non spécifique en stimulant la phagocytose dans ses fonctions d'englobement, de captation et de digestion.

Or, l'action des vaccins est la suivante :

- les vaccins vivants (type B 19) stimuleraient les phagocytes dans leur fonction d'inhibition de la multiplication intracellulaire des *Brucella* et provoqueraient la production d'opsonines ;

- les vaccins tués (type 45/20) n'agiraient que par leur production d'opsonines.

Mais, outre cette action bénéfique, le fait de vacciner un animal fait apparaître, de façon plus ou moins intense et plus ou moins durable, des anticorps. Or, la distinction entre anticorps infectieux et post-vaccinaux n'est pas facile à déterminer. En effet, lors d'une infection brucellique, les agglutinines par exemple apparaissent dans les trois groupes d'immunoglobulines IgA, IgG, IgM, avec une prédominance des IgG (8). Après une vaccination au B 19, les agglutinines qui apparaissent sont en majorité des IgM. Ainsi, les proportions respectives des IgG et des IgM sont inversées selon qu'il s'agit du sérum d'un animal vacciné ou d'un animal infecté. En réalité, une telle distinction ne semble valable que pendant un temps relativement court, car les IgM disparaissent assez rapidement pour laisser place aux IgG. Il semble donc impossible, en pratique, de faire la différence entre anticorps post-vaccinaux et post-infectieux.

Comme le dépistage de la Brucellose repose essentiellement sur la recherche des anticorps, il est important d'assurer des modalités vaccinales perturbant au minimum la sérologie de l'animal vacciné.

Que peut-on attendre des méthodes vaccinales actuelles ?

Selon JOUBERT (2), un vaccin antibrucellique doit présenter quatre qualités idéales, à vrai dire, jamais rassemblées dans une même préparation :

— L'innocuité, en particulier l'inaptitude à provoquer des avortements ou un portage de germes chez l'animal et une contamination de l'homme.

— L'efficacité, qui doit s'exprimer non seulement par une protection partielle contre les avortements, mais aussi et surtout, par une protection totale contre la Brucellose-infection latente. La prophylaxie d'un avortement, que certains ont appelé "prophylaxie du portefeuille", ne peut en aucun cas aboutir à une éradication totale de la maladie.

— La compatibilité avec le dépistage sérologique et éventuellement allergique, qui implique l'inaptitude à déterminer la formation d'anticorps à des taux supérieurs aux taux diagnostic ou à susciter des réactions allergiques

de nature à interférer avec des mesures sanitaires basées sur un système comparable à celui de la prophylaxie de la tuberculose.

— La commodité d'emploi, c'est-à-dire sa validité, son prix de revient, l'importance de la dose vaccinale et des réactions locales.

Les vaccins utilisés appartiennent à deux groupes différents : d'une part, un vaccin vivant, composé de la souche Buck 19, et d'autre part, un vaccin inactivé : le vaccin 45/20 (souche Mac Ewen).

Vaccin B 19 (9) : Ce vaccin utilise la souche Buck 19 de *Brucella abortus*, isolée du lait d'une vache brucellique et entretenue au laboratoire par repiquages sur pomme de terre. Cette souche s'est révélée particulièrement stable. Aucune modification de son pouvoir pathogène, antigène et immunigène n'a été observée depuis son isolement. Elle a été sélectionnée pour ses propriétés immunogènes et sa faible virulence.

Sur les jeunes femelles bovines, la vaccination s'effectue à l'âge de quatre à six mois par voie sous-cutanée. Aucun rappel n'est autorisé pour éviter une séro-conversion durable. En effet, lorsque l'injection du vaccin B 19 est pratiquée à six mois, le titre des anticorps agglutinants augmente durant le premier mois, puis décroît et tombe à moins de 30 UI au bout d'un an. Cependant, on estime que 5 à 10 % des animaux vaccinés gardent des anticorps agglutinants à des titres supérieurs au taux diagnostic et risquent d'être considérés comme infectés et éliminés pour tels.

L'immunité conférée par cette vaccination décroît au cours de la deuxième et de la troisième gestation. Une vaccination de rappel, à condition qu'elle soit réalisée après le premier vêlage, confèrerait une immunité définitive. Or, elle n'est pas autorisée dans le cadre du programme de prophylaxie basé sur l'abattage des animaux séro-réagissants.

D'autre part, si la protection conférée par ce vaccin semble bonne en milieu sain, il n'en est pas de même en milieu fortement contaminé, d'où des problèmes d'éradication de la Brucellose dans ces milieux (se reporter aux expériences sur le terrain décrites dans la seconde partie).

Vaccin 45/20 (9) : La souche 45/20 est une souche en phase R, de *Brucella abortus*. Elle fut obtenue en 1945 par Mac EWEN après 20 passages alternés bovin-cobaye.

La vaccination s'effectue sur les jeunes femelles bovines entre l'âge de 4 à 12 mois, à raison de deux injections à un mois d'intervalle, et ce par voie sous-cutanée.

Or, si deux vaccinations anti-brucelliques au 45/20 ne suscitent pas par elles-mêmes la production d'anticorps, l'une d'elles est capable, en rappel, de réveiller les réactions de formation d'anticorps chez les animaux préalablement sensibilisés par l'infection naturelle ou par une vaccination avec des vaccins vivants.

De plus, la pratique de tels vaccins montre que parfois se produisent des escarres ou des abcès importants au point d'injection.

Comme on peut le voir, il n'existe pas de méthode parfaite actuellement. Cependant, la prophylaxie de la Brucellose a enregistré de grands progrès récemment. Le taux d'animaux infectés est de 0,4 %. Le taux de cheptels infectés est de 2,3 %. Mais des zones restent encore très fortement contaminées et la prophylaxie sanitaire doit toujours être associée à une prophylaxie médicale la plus efficace et la moins contraignante possible pour obtenir un assainissement. Tant que l'infection persistera dans ces zones, la poursuite de la vaccination dans les zones assainies paraît fortement souhaitable pour pallier les dangers représentés par :

- l'exportation d'animaux des zones infectées vers les zones assainies,
- l'introduction en zones infectées d'animaux de remplacement indemnes certes, mais non protégés contre la contamination qui subsistera jusqu'à l'aissainissement définitif.

Enfin, avec les progrès de la prophylaxie, apparaissent les troupeaux "à problèmes", c'est-à-dire, selon la définition des Anglo-Saxons, des troupeaux que l'on croit assainis, mais où surviennent des recontaminations d'origine interne. Les diagnostics de routine ne peuvent dépister le ou les animaux responsables de ces ennuis.

Supprimer la vaccination semble donc très aléatoire dans les conditions actuelles. Comme nous l'avons vu, les vaccins autorisés actuellement sont les vaccins B 19 et 45/20. Le premier assure une bonne immunité, mais provoque l'apparition d'anticorps pouvant persister chez quelques animaux à un titre significatif. Le second donne une bonne protection en première gestation, mais on ne connaît pas la durée de l'immunité lorsque des rappels annuels ne sont pas faits. Dans les deux cas, l'obligation de vacciner dans une fourchette d'âge réduite pour diminuer la persistance des anticorps est souvent une gêne pour les éleveurs et les vétérinaires.

L'ensemble de ces problèmes a entraîné la mise en oeuvre d'une méthode de vaccination originale, visant à diminuer la réponse sérologique par l'utilisation d'une dose réduite de vaccin B 19, instillée par voie conjonctivale, à augmenter la protection en faisant des rappels rendus possibles par une réponse sérologique effectivement minime, et visant à supprimer les contraintes dues aux fourchettes d'âge à respecter.

L'étude de cette méthode constituera donc la majeure partie de notre travail.

Dans une première partie, nous rapporterons les résultats des expériences effectuées à la Station de l'I.N.R.A. de Tours (Nouzilly) dans le cadre de la mise au point de la méthode.

La seconde partie donnera les résultats des tentatives d'éradication de la Brucellose, réalisées sur le terrain, suivant les modalités définies précédemment.

Enfin, la troisième partie de notre étude nous permettra de mettre en évidence l'innocuité de la méthode et de proposer sa mise en oeuvre pratique.

Première Partie

MISE AU POINT DE LA METHODE VACCINALE

A - EPREUVES SUR COBAYES (3)

Le cobaye est l'animal d'expérience recommandé pour tester la puissance du vaccin B 19. Contrairement à la souris, il est sensible à l'inoculation de *Brucella* par voie conjonctivale : la dose infectante 50 p. 100 (DI_{50}) pour la souche 544 est de l'ordre de 10^5 bactéries, alors qu'elle est de 10^2 bactéries par voie intramusculaire.

L'inoculation par voie conjonctivale de la souche B 19 pourrait induire par colonisation des ganglions régionaux une certaine immunité. Cette immunité serait alors mesurée par la méthode traditionnelle d'inoculation intramusculaire des cobayes, avec souche virulente *Brucella abortus* 544 d'épreuve.

I. - But des manipulations

Dans cette étude, ont été déterminées sur le cobaye la réponse sérologique à la vaccination utilisant la souche B 19 administrée à des doses différentes par voie conjonctivale, et la protection que cette vaccination pouvait conférer.

Trois expériences successives furent effectuées.

1. Expérience A

Elle avait pour but de déterminer quelle dose vaccinale, administrée une ou deux fois par voie conjonctivale, était capable d'induire une immunité convenable, sans réaction sérologique significative. Deux combinaisons optimales furent définies : elles consistaient en deux instillations oculaires, respectivement de 10^6 ou 10^7 bactéries, à trois mois d'intervalle.

2. Expérience B

Elle permettait de déterminer l'efficacité de deux doses de 10^6 bactéries, comparées à :

- la vaccination standard, appliquée aux cobayes, c'est-à-dire 7×10^9 bactéries en sous-cutanée ;
- la vaccination standard, suivie d'une nouvelle vaccination avec 10^6 bactéries, administrée par voie conjonctivale ;
- la vaccination par deux injections sous-cutanées de 10^6 bactéries à trois mois d'intervalle.

3. Expérience C

Elle étudiait la seconde combinaison optimale (2 doses de 10^7 bactéries par voie conjonctivale), comparée à la méthode de vaccination standard, avec ou sans seconde vaccination par voie conjonctivale. Les réponses sérologiques à la vaccination ne furent pas étudiées dans cette dernière expérimentation, car entre temps, cette réponse avait été déterminée sur le bétail. Dans la pratique, une vaccination de rappel au 45/20 est souvent effectuée sur le bétail, parfois après une vaccination au B 19.

Il semble utile de comparer l'efficacité de cette vaccination de rappel au 45/20 à une vaccination au B 19 par voie conjonctivale.

II. - Matériel et Méthodes

1. Animaux

Les cobayes de la souche Hartley Albinos, avaient deux mois et pesaient 350 à 400 g au début des expériences. Pour l'expérience A, seuls les mâles disponibles furent utilisés et dans les expériences B et C, seules les femelles le furent.

2. Préparation du vaccin et des suspensions d'épreuve

La souche vaccinale *Brucella abortus* B 19 provenait du National Animal Diseases Laboratory d'Ames (U.S.A.). La souche *Brucella abortus* 544 d'épreuve provenait du Central Veterinary Laboratory de Weybridge (Grande-Bretagne). Elles furent lyophilisées et une ampoule nouvelle fut utilisée pour la préparation des suspensions destinées à chaque expérience.

Le contenu de l'ampoule fut mis en suspension dans trois gouttes de bouillon, étalé à la surface d'une couche de *Brucella agar Albimi* (Pfizer), mis en incubation dans une atmosphère contenant 10 % de CO_2. Après transfert intermédiaire, une culture de 24 heures sur le même milieu fut mise en suspension dans une solution salée tamponnée, standardisée par photométrie à 600 mμ, puis diluée de façon à obtenir la concentration désirée.

Le comptage des bactéries vivantes de l'inoculum fut réalisé en étalant une dilution convenable de la suspension finale sur 10 boîtes de Pétri de trypticase soy-agar (TSA BIO, Mérieux). Le vaccin utilisé (45/20) fut le vaccin commercialisé (ABORTOX, Mérieux) composé d'une suspension de *Brucella abortus* en phase R. souche 45/20 inactivée et adjuvée. Ce vaccin fut utilisé à des doses de 10^{10} bactéries, administrées par voie sous-cutanée, pour les vaccinations de rappel.

3. Protocole d'expérimentation

Le protocole officiel pour le contrôle de l'efficacité du vaccin B 19 est le suivant :

- Vaccination du cobaye par voie sous-cutanée avec une dose de 7×10^9 bactéries ; 60 jours plus tard, l'épreuve consiste en une injection intramusculaire de 5×10^3 bactéries de souche 544 ; 40 jours plus tard, on réalise l'autopsie et la recherche de *Brucella* dans la rate.

Le protocole expérimental a été modifié comme suit (Fig. 1) :

- L'intervalle entre une vaccination simple et l'inoculation d'épreuve fut soit de 3 mois (expérience A), soit de 6 mois (expériences B et C).

- Les groupes subissant une seconde vaccination après 3 mois furent éprouvés 3 mois après cette seconde vaccination.

- A l'autopsie (40 jours après l'épreuve), les *Brucella* furent recherchées et comptées dans la rate et dans huit ganglions.

- Des échantillons de sang furent récoltés par ponction cardiaque, à des périodes variables après la vaccination, sur des animaux représentatifs dans chaque groupe.

- Les vaccinations consistaient en une ou deux administrations des doses et par la voie appropriée pour chaque expérience, comme indiqué dans les tableaux 1, 2 et 3.

Les injections sous-cutanées et intramusculaires furent de 0,2 ml. L'instillation par voie conjonctivale fut effectuée en déposant 5 µl sur l'oeil à l'aide d'une microseringue de 25 µl.

4. Dénombrement des *Brucella* dans la rate et les ganglions

A l'autopsie, la rate et huit ganglions ou groupes de ganglions furent prélevés stérilement : un ou deux iliaques, un mésentérique, deux cervicaux, deux sous-maxillaires, l'axillaire droit et gauche, le précrural droit et gauche.

La rate fut dégraissée, pesée et broyée dans quatre fois son poids d'eau. De cette suspension et à partir de dilutions successives adéquates, des doses à 0,1 ml furent étalées sur deux boîtes de Pétri de milieu TSA, puis mises en incubation dans une atmosphère de CO_2, pendant 5 à 8 jours. Les colonies

de *Brucella* furent comptées sur les boîtes de Pétri, qui contenaient entre 30 et 500 colonies, ou moins de 30 dans le cas de la suspension d'origine diluée au 1/5. Le plus petit nombre décelable fut de 50 *Brucella* par rate. Le nombre pour chaque rate fut représenté par son logarithme décimal et l'absence de *Brucella* par la valeur 0. Ces valeurs permettaient donc de rendre compte de l'intensité de l'infection splénique pour chaque groupe de cobaye.

Les ganglions furent également dégraissés, découpés, appliqués sur une boîte de Pétri en pressant pour en extraire le suc. Après incubation, les colonies de *Brucella* furent comptées. Leur nombre a été exprimé selon l'échelle logarithmique suivante :

- 1 pour 1 à 4 colonies,
- 2 pour 5 à 24 colonies,
- 3 pour 25 à 124 colonies,
- 4 pour plus de 125 colonies.

L'expression de ces valeurs représente l'état d'infection des ganglions.

5. Examens sérologiques

Quatre à six cobayes, choisis au hasard dans chaque groupe à des intervalles variés après la vaccination, furent saignés par ponction cardiaque. Les titres d'agglutinines et d'anticorps fixant le complément furent déterminés par la méthode du microtiter (7) commençant par une dilution au 1/5 et par comparaison au sérum de référence ayant un titre de 1/640 dans les deux épreuves.

III. - Résultats

1. Expérience A : Choix d'une dose optimale de vaccin pour administration conjonctivale

Le tableau 1 montre, par comparaison avec les témoins, qu'une simple vaccination par voie conjonctivale avec une dose de 10^6 bactéries ne confère aucune protection. La même dose par voie sous-cutanée induit une certaine immunité, comme le prouve le niveau réduit d'infection dans la rate et les ganglions. Des doses plus fortes administrées par voie conjonctivale confèrent une protection mesurable,, comme le montre la réduction de l'infection (pour la dose de 10^7) et la protection (pour les doses de 10^8 et 10^9).

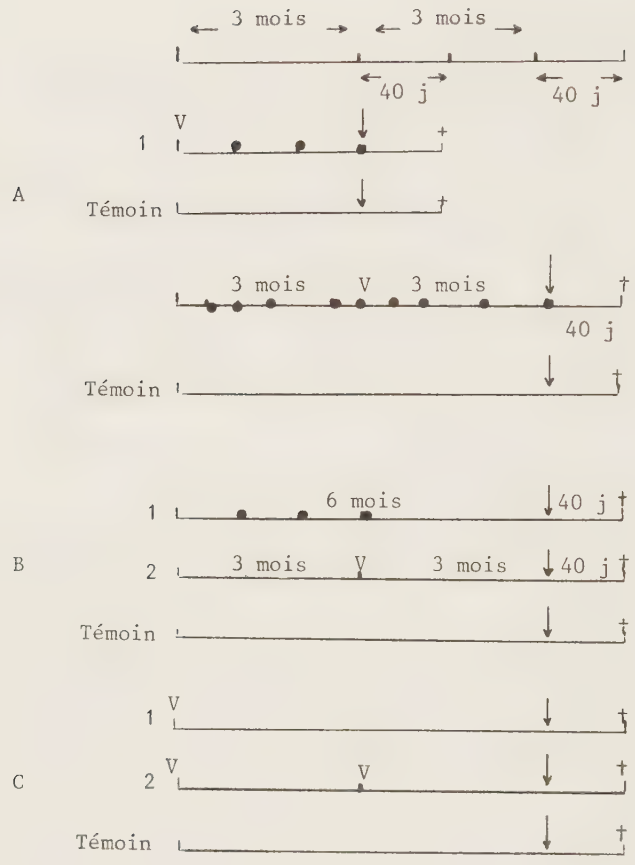

Fig. 1 : Schéma des 3 méthodes expérimentales

V : vaccination
† : autopsie
↓ : épreuve
• : échantillon sanguin

Tableau 1 : Expérience A : protocole, protection et infection

Vaccination			Protection (2)	Intensité de l'infection	
Dose	Nombre	Voie(1)		Rate(3)	Ganglion
10^6	1	C	0/8	5,6	2,7
10^7		C	0/8	2,8	1,1
10^8		C	4/9	1,7	0,7
10^9		C	3/10	2,3	0,6
10^6		S/C	0/8	2,8	1,0
Contrôle			0/11	5,2	2,6
10^6	2	C	6/8	0,9	0,1
10^7		C	4/6	1,1	0,3
10^8		C	8/10	0,5	0,1
10^9		C	4/10	1,5	0,1
Contrôle			0/10	5,7	1,9

(1) C = voie conjonctivale - S/C = voie sous-cutanée

(2) Cobayes protégés/total : protégés = absence de *Brucella* dans les échantillons

(3) Moyenne du Log du nombre total de *Brucella* par rate et index d'infection des ganglions lymphatiques

Deux vaccinations par voie conjonctivale à 3 mois d'intervalle entraînent une immunité significative, même avec des doses de 10^6 bactéries.

La Figure 2 donne l'évolution des anticorps anti-*Brucella* après la vaccination. Chaque point représente le titre moyen de 4 sérums. La réaction d'agglutination se révèle faible, excédant rarement un titre moyen de 1/40, même après une seconde vaccination. Les fluctuations anormales observées sont dues, sans doute, au petit nombre de sérums récoltés en vue de limiter les accidents dus aux ponctions cardiaques.

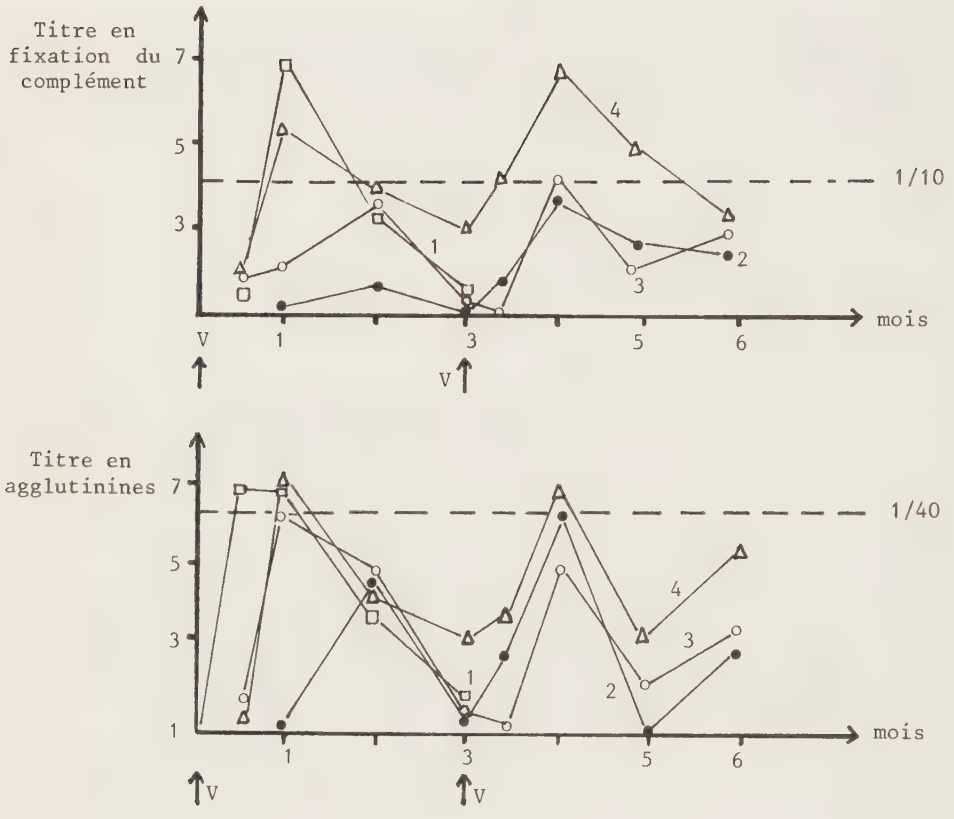

Fig. 2 : Evolution des titres des agglutinines et des anticorps fixant le complément au cours de l'expérience A

Moyenne géométrique des titres de 4 cobayes par lot.

Le lot 10^8 identique au lot 10^9 n'est pas représenté.

Le chiffre 3 représente la réaction 50 % à la dilution 1/5

V = vaccination

1 : 10^6 VSC ; 2 : 10^6 VC ; 3 : 10^7 VC ; 4 : 10^8 VC

Les réponses en fixation du complément furent inférieures au 1/10 pour des doses de 10^6 et 10^7 inoculées par voie conjonctivale, même après la seconde vaccination. Avec des doses plus grandes, la réponse fut plus importante, surtout après une deuxième vaccination. La vaccination avec 10^6 bactéries par voie sous-cutanée entraîne une réponse plus rapide pour l'agglutination et plus importante pour la fixation du complément, que la vaccination par voie conjonctivale.

Donc, les réponses sérologiques à la vaccination par voie conjonctivale en rapport avec le but de cette expérience entraîne le choix des 2 doses les plus faibles (10^6 et 10^7 bactéries). Cependant, avec ces doses, on obtient une bonne protection seulement après une seconde vaccination.

L'efficacité de cette méthode est comparée à la vaccination standard dans les expériences suivantes.

2. Expérience B : Efficacité de 2 vaccinations par voie conjonctivale avec une dose de 10^6 bactéries

Comme le montre le tableau 2, la vaccination par voie conjonctivale avec 2 doses successives de 10^6 bactéries confère une protection identique à celle obtenue par la vaccination standard à la dose unique de 7×10^9 bactéries par voie sous-cutanée.

La revaccination par voie conjonctivale avec une dose de 10^6 bactéries accroît l'immunité conférée par la vaccination standard de 40,7 % à 67 %.

Deux vaccinations avec 10^6 bactéries par voie sous-cutanée procurent la meilleure protection (75 %), meilleure que celle obtenue par 2 vaccinations par voie conjonctivale ou par la vaccination standard. La réponse sérologique est indiquée sur la Figure 3. Une dose de 7×10^9 bactéries par voie sous-cutanée fait apparaître de hauts titres qui augmentent après la revaccination avec 10^6 bactéries par voie conjonctivale. La dose de 10^6 bactéries par voie sous-cutanée entraîne une réponse moyenne, qui augmente après la revaccination, surtout pour la fixation du complément. La dose de 10^6 bactéries par voie conjonctivale provoque seulement de faibles titres, même après la revaccination.

Il semble alors que la dose de 10^6 bactéries administrée deux fois par voie conjonctivale n'est pas capable de conférer une immunité aussi grande que celle obtenue avec les mêmes doses inoculées cette fois par voie sous-cutanée.

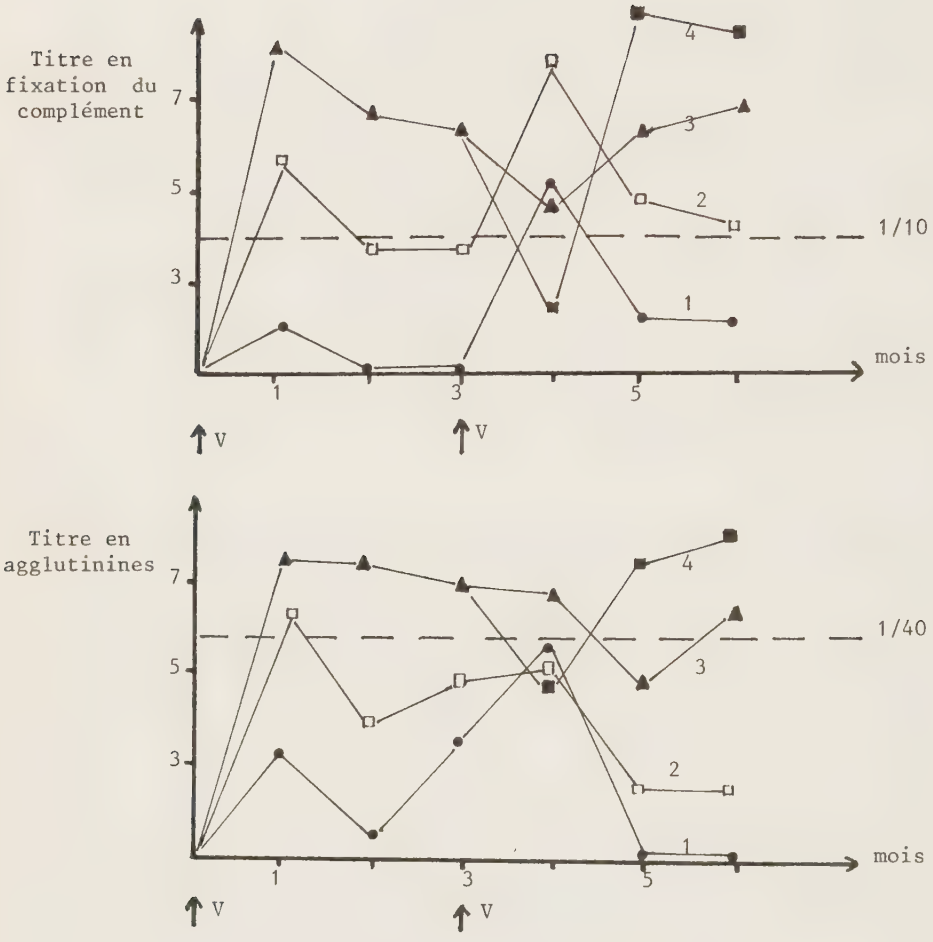

Fig. 3 : Evolution des titres des anticorps dans l'expérience B.
Moyenne des titres de 6 cobayes par lot.
1 : 10^6 VC ; 2 : 10^6 VSC ; 3 : 7 x 10^9 VSC ; 4 : 7 x 10^9 VSC + 10^6 VC

Tableau 2 : Expérience B : protocole, protection et infection

Vaccination			Protection(2)	Intensité de l'infection	
Dose	Nombre	Voie(1)		Rate(3)	Ganglions
7×10^9	1	S/C	11/27 (40,7 %)	2,0	0,6
10^6	2	C	10/26 (38,5 %)	3,2	1,1
10^6	2	S/C	12/16 (75 %)	0,7	0,4
$7 \times 10^9 + 10^6$	2	S/C + C	18/27 (67 %)	1,1	0,5
Contrôle			0/20 (0)	5,4	2,8

(1) S/C = voie sous-cutanée - C= voie conjonctivale

(2) Cobayes protégés/total : protégés = absence de *Brucella* dans les échantillons

(3) Moyenne du Log du nombre total de *Brucella* par rate et index d'infection des ganglions lymphatiques

3. Expérience C : Efficacité des deux vaccinations par voie conjonctivale avec 10^7 bactéries

La protection obtenue dans cette expérimentation est du même ordre pour chaque groupe, que celle obtenue par vaccination standard (40 %) (tableau 3).

A part quelques petites différences, on voit que la protection et le niveau d'infection des groupes vaccinés deux fois par voie conjonctivale sont meilleurs que ceux obtenus avec la vaccination standard, alors que la réciproque est vraie pour l'expérience B avec des doses de 10^6 bactéries.

Tableau 3 : Expérience C : protocole, protection, infection

Vaccination			Protection (2)	Intensité de l'infection	
Dose	Nombre	Voie(1)		Rate(3)	Ganglions
7×10^9	1	S/C	12/30 (40 %)	3,0	0,8
10^7	2	C	14/30 (46,7 %)	2,1	0,4
$7 \times 10^9 + 10^7$	2	S/C + C	14/29 (48,3 %)	2,5	0,8
$7 \times 10^9 + 10^{10}$*	2	S/C + S/C	13/28 (46,4 %)	2,5	0,8
Contrôle				6,1	2,5

* Deuxième vaccination au 45/20

(1) C = voie conjonctivale - S/C voie sous-cutanée

(2) Cobayes protégés/total : protégés = absence de *Brucella* dans les échantillons

(3) Moyenne du Log du nombre total de *Brucella* par rate et index d'infection des ganglions lymphatiques

IV. - Discussion

Les expériences A, B et C suivirent le même protocole, à l'exception des groupes de l'expérience A recevant seulement une seule vaccination. De façon à augmenter le nombre d'animaux par groupe et de réduire les variations inévitables dans ce genre d'expérience, nous avons combiné les données de chaque groupe similaire dans les trois expériences. Les groupes de l'expérience A recevant 2 doses de 10^8 et 10^9 bactéries furent associés et les groupes des expériences B et C recevant une dose de 10^6 ou 10^7 bactéries après la vaccination standard furent groupés. Le tableau 4 résume les résultats.

Les meilleurs résultats sont donnés par 2 vaccinations à 3 mois d'intervalle avec deux doses faibles, administrées par voie sous-cutanée. Les résultats sont significativement meilleurs que ceux obtenus par la vaccination standard, mais pas significativement meilleurs que ceux obtenus par une vaccination

standard suivie d'une vaccination par voie conjonctivale. La vaccination avec deux petites doses instillées sur la conjonctive, à 3 mois d'intervalle, confère une protection qui semble dépendre de la dose. Cependant, la dose intermédiaire de 10^7 bactéries, avec 50 % de protection, n'est pas significativement supérieure à la vaccination standard, et n'est pas significativement inférieure à la vaccination avec 2 doses de 10^6 bactéries par voie sous-cutanée.

Tableau 4 : Résultats globaux des expériences A, B et C

Vaccination			Protection	Infection de la rate
Dose	Nombre	Voie		
10^6	2	C	16/34 (47 %)	2,69
10^7	2	C	18/36 (50 %)	1,93
10^8 ou 10^9	2	C	12/20 (60 %)	1,02
10^6	2	S/C	12/16 (75 %)	0,77
7×10^9	1	S/C	23/57 (40 %)	2,57
$7 \times 10^9 + 10^6$ ou 10^7	2	S/C + C	32/56 (57 %)	1,86
Contrôle			0/45 (0)	5,61

En dépit de la mise en commun des données, le nombre des animaux par groupe est encore insuffisant pour montrer des différences significatives dans la protection, si elles existent, attribuables à la dose ou à la voie d'inoculation, à l'intérieur des groupes recevant deux vaccinations à un intervalle de 3 mois.

Au niveau de protection observée (50 à 75 %), il semblerait nécessaire, en fait, d'avoir plus de 100 animaux par groupe pour montrer de telles différences.

Les réponses sérologiques aux différentes méthodes de vaccination furent comme attendu :

- une réponse significative après une vaccination standard, suivie d'une réponse secondaire différente après une deuxième vaccination avec une faible dose par voie conjonctivale,
- une réponse modérée après vaccination par une faible dose par voie sous-cutanée et une réponse secondaire après revaccination,
- une réponse faible ou nulle après vaccination par voie conjonctivale avec des doses de 10^6 ou 10^7 bactéries, même après une revaccination.

Les données utilisables pour discuter du mécanisme d'immunisation obtenu sous ces conditions ne sont pas suffisantes. Tout au plus est-il possible de dire que l'administration d'une très faible dose de vaccin vivant par voie conjonctivale limite la diffusion de l'antigène au ganglion régional. Les cellules stimulées sous ces conditions peuvent induire une immunité de type cellulaire. En outre, la synthèse d'anticorps étant minime, il n'y a pas de compétition antigénique entre les sites récepteurs des lymphocytes compétents et ceux des immunoglobines, et la réponse cellulaire est beaucoup plus grande que celle attendue avec les très petites doses d'antigène utilisées.

L'application de cette méthode de vaccination au bétail réclame une étude soignée de la dose vaccinale convenable :

- une dose trop faible, équivalente à 10^6 bactéries sur le cobaye par exemple, donnerait une immunité insuffisante ;
- une dose trop élevée, équivalente à 10^8 ou 10^9 sur le cobaye, donnerait une réaction sérologique indésirable.

Il faut donc avant tout déterminer chez le bétail la dose vaccinale convenable, les possibilités pour cette souche vaccinale de traverser la muqueuse conjonctivale et de se multiplier ou survivre dans un environnement immuno-compétent, dose et possibilités pouvant être très différentes d'une espèce hôte à l'autre.

B - DETERMINATION DE LA DOSE - EXPERIENCE SUR VACHES ADULTES (4)

Avant d'entreprendre une expérience sur la protection du bétail, cette étude va contribuer à déterminer la meilleure dose permettant d'obtenir :

- la colonisation de la souche vaccinale dans les ganglions drainant la zone orbitale (on considère que la colonisation pour au moins un mois est une condition nécessaire pour l'induction d'une immunité à médiation cellulaire convenable) ;
- une réponse sérologique aussi faible que possible.

Pour cela, des génisses ont été vaccinées à partir de 4 mois, avec des doses différentes de vaccin, par voie conjonctivale. A l'autopsie, 15 ou 30 jours plus tard, nous avons recherché les bactéries dans les ganglions de la tête.

Nous avons aussi étudié la réponse sérologique sur les génisses au moment de l'abattage et sur des adultes un mois et demi après la vaccination par voie conjonctivale avec différentes doses. Des vaches recevant par voie sous-cutanée des bactéries tuées servirent de contrôle.

I. - Matériel et méthodes

1. Animaux et échantillons

— 71 veaux (des mâles pour la plupart) ayant de 3,5 à 4,5 mois au moment de la vaccination sont abattus 15 $\pm$ 2 jours ou 30 $\pm$ 2 jours plus tard. A l'abattage, du sang, les deux ganglions rétropharyngiens et parotidiens et sous-maxillaires furent prélevés.

— 18 vaches, indemnes de brucellose et n'ayant eu aucune vaccination précédemment ont été utilisées. Elles sont âgées de 25 à 26 mois au moment de la vaccination, inséminées depuis environ 2 mois pour la deuxième gestation. Des échantillons sanguins furent récoltés 15, 28 et 42 jours après la vaccination.

2. Vaccin

Il est préparé comme précédemment (cf. p. 9, § II.2.) et utilisé sous trois formes : vaccin frais, vaccin lyophilisé, vaccin formolé.

3. Vaccination

L'une ou l'autre des deux premières suspensions furent administrées par voie conjonctivale avec une pipette calibrée, en déposant sur la cornée de l'oeil droit, une goutte contenant 0,05 ml.

4. Dénombrement des *Brucella* dans les ganglions

Les ganglions furent récoltés à l'abattoir, mis en culture immédiatement ou après stockage à - 20° au maximum 8 jours.

Chaque ganglion fut dégraissé, coupé en deux, mis dans un "masticateur" pour extraire le suc qui fut étalé sur une boîte de Pétri de milieu WE. Après une incubation de 8 jours à 37°, on dénombre les colonies de *Brucella*.

5. Titrage des anticorps vaccinaux

Les tests sérologiques furent effectués :

- sur le sérum des vaches : par la méthode du microtiter,
- sur le sérum de veau par le test standard d'agglutination en tube, de telle sorte que les mêmes dilutions de sérum puissent être employées pour le test de Coombs.

Les tests au Rose Bengale sur plaque furent effectués sur des sérums provenant du dernier groupe de vaches vaccinées.

Tous les tests sérologiques furent contrôlés avec le sérum de référence du laboratoire qui donna une réaction 50 % à une dilution de 1/640 en agglutination et en fixation du complément.

II. - Résultats

1. Réponse sérologique des vaches à l'administration de B 19 par voie conjonctivale (tableau 5)

La suspension vaccinale fraîche fut administrée par voie conjonctivale à 10 vaches avec 5 doses différentes, et une dose pour deux vaches. Pour les contrôles de négativité, deux vaches reçurent 0,05 ml de solution salée. Pour les contrôles de positivité, six vaches reçurent une forte dose (2,5 à 5 x 10^{10} bactéries), de la suspension formolée, et ce par voie sous-cutanée.

Les contrôles positifs montrèrent une réponse maximale à l'agglutination 15 jours après la vaccination, mais pas de réaction à la fixation du complément (< 1/5).

La réponse des vaches vaccinées par voie conjonctivale fut négative à l'agglutination (moins de 30 UI), sauf pour les doses les plus fortes (10^{10} bactéries). Aucune réaction à la fixation du complément ne fut positive.

2. Colonisation du ganglion régional et réponses sérologiques des veaux recevant du B 19 par voie conjonctivale

Deux expérimentations successives furent effectuées. Tout d'abord, les veaux reçurent 10^6 à 10^{10} bactéries à partir de la suspension fraîche (tableau 6). Dans la deuxième expérience, les veaux reçurent 1 à 5 x 10^9 bactéries provenant de la suspension lyophilisée (tableau 7). Aucune différence n'étant observée entre les deux types de suspension, nous avons analysé les résultats ensemble.

Tableau 5 : Réponses sérologiques du bétail après vaccination

Voie	Dose	Taux d'agglutinines après la vaccination(1)						
		0	7	15	21	28	42	49
		Souche B 19 tuée au formaldéhyde						
S/C*	2,5 x 10^{10}	5	160	1.280	640	320	80	80
		20	80	640	320	320	80	80
		10	20	320	320	320	80	40
	5 x 10^{10}	20	320	1.280	1.280	320	320	320
		20	320	2.560	640	640	80	160
		20	320	2.560	1.280	1.280	320	160
		Souche B 19 vivante						
C*	10^6	20(2)	NON DETERMINE	20	NON DETERMINE	20	20	NON DETERMINE
		20		20		20	20	
	10^7	10		20		20	20	
		20		20		20	20	
	10^8	20		20		20	20	
		10		20		20	20	
	10^9	5		20		20	20	
		10		10		10	10	
	10^{10}	10		160		80	40	
		10		40		40	20	
	Contrôle	10		10		10	10	
		10		20		10	20	

*S/C = Injection sous-cutanée - C = Injection conjonctivale

(1) Réciproque de dilution donnant 50 % d'agglutination
(2) Agglutination moins de 1/20

10 = 15 UI

Tableau 6 : Réponse de veaux recevant des doses variables de suspension fraîche du vaccin B 19 sur la cornée droite.
Les titres d'anticorps proviennent des analyses de sang pris à l'abattoir. Les tests de séro-agglutination sont marqués aux plus hautes dilutions positives, avec 0 équivalent à un taux inférieur au 1/10. Tous les tests de fixation du complément sont négatifs.

Dose	Jours (1)	Nbre de veaux	Colonisation(2) des ganglions(3)						Taux d'AC	
			Gauche			Droit			Aggl.	Coombs
			RP	P	M	RP	P	M		
$0,85 \times 10^6$	17	5	0	0	0	0	0	0	0	
$1,1 \times 10^7$	17	5	0	0	0	0	0	0	0	
$1,25 \times 10^8$	17	6	0	0	0	0	0	0	0	
$1,06 \times 10^9$	17	6	0	0	0	0	0	0	0	
3×10^{10}	17	6	0	0	0	0	0,1 1,1 4,1	2,1 3,0 0,2	0	0,0 0,0 0,160
10^9	17	3	0	0,1 0,0	0,1 0,0	0	2,2 2,1	0,1 0,0	0,0 10,10	0

(1) Entre la vaccination et l'abattage

(2) Nombre de colonies isolées : 0 = aucune ; 1 = 1 à 4 ; 2 = 5 à 24 ; 3 = 5 à 124 ; 4 = > 125

(3) RP : rétropharyngien ; P : parotidien ; M : sous-maxillaire

Tableau 7 : Réponse des veaux recevant des doses variées de vaccin lyophilisé B 19 sur la cornée droite.
(Tous les tests d'agglutination, de fixation du complément et du rose bengale furent négatifs)

Dose	Jours (1)	Nbre de veaux	Colonisation des ganglions						Taux d'AC Coombs
			Gauche			Droit			
			RP	P	M	RP	P	M	
$1,26 \times 10^9$	29	5	0	0	0	0	2,0 1,2 0	0,0 3,0 0	0
$1,16 \times 10^9$	15	5	0,2	1,1 0,0 2	0	0,0 2,0 0	0,3 3,1 0	0,0 3,0 0	0
$5,08 \times 10^9$	15	5	0,0	2,0 0,3 0	0	1,4 0,2 3	2,0 4,3 0	1,2 0,2 0	0
$5,12 \times 10^9$	28	4	0	0	0	0	3,2 2,1	0,0 1,2	0 160,160
10^9	14	5	0 1,0	0	0	0,0 3,0 0	4,3 0,2 1	0,2 2,0 2	0
10^9	28	6	0	0	0	0,0 0,1 0,0	0,0 1,0 1,0	2,1 0,0 0,2	0,80 80,0 0,0

(1) Entre la vaccination et l'abattage

26 des 34 veaux recevant une dose d'environ 10^9 bactéries présentent une réaction ganglionnaire. Des doses de 5×10^9 et 10^{10} bactéries induisent une colonisation sur tous les veaux (9/9 et 12/12).

Le nombre de *Brucella* est plus important le 15e jour que le 30e jour après la vaccination. La moyenne des intensités d'infection pour chaque ganglion est de 0,72 à 15 jours et 0,19 à 30 jours pour les veaux recevant 10^9 bactéries, de 0,97 et 0,46 pour ceux recevant 5 x 10^9 bactéries.

Un tropisme est observé pour le ganglion droit, la conjonctive droite étant inoculée.

- Parotidien droit : 34 fois infecté - rétropharyngien droit : 10 fois ;
- Parotidien gauche : 10 fois infecté - rétropharyngien gauche : 2 fois ;
- Sous-maxillaire droit : 27 fois ;
- Sous-maxillaire gauche : 7 fois.

3. Réponses sérologiques

Des sérums récoltés de 14 à 31 jours après la vaccination conjonctivale montrèrent une réaction sérologique très faible, quelle que soit la dose administrée.

Toutes les réactions de fixation du complément furent négatives, ainsi que les épreuves au Rose Bengale. Quatre sérums seulement eurent des réactions à l'agglutination au 1/10 et un au 1/20 (30 UI). Seuls cinq sérums furent positifs au test de Coombs sur un total de 55 veaux recevant 10^9 bactéries ou plus.

III. - Discussion

Il fut considéré que la dose de vaccin B 19 la plus convenable pour l'inoculation conjonctivale était celle entraînant la colonisation d'au moins un ganglion régional pendant au moins 1 mois. Il a été établi (en réduisant les investigations aux ganglions les plus accessibles de la tête : rétropharyngien, sous-maxillaire, parotidien), qu'une dose égale ou supérieure à environ 5 x 10^9 bactéries répondait à ce critère. Une dose de 10^9 bactéries s'avère insuffisante.

Des doses de 5 x 10^9 bactéries entraînent sur les veaux des réactions sérologiques insignifiantes, sauf pour un petit nombre qui fait une réaction faible au test de Coombs. Sur les vaches, cependant, des doses de 10^9 bactéries

donnent des réactions transitoires en agglutination. Néanmoins, la dose idéale de 5 x 10^9 bactéries n'entraîne aucune réaction sérologique importante ou durable aux trois tests. Les vaches adultes peuvent développer après une primo-vaccination, de légères réactions transitoires et/ou après une revaccination.

• Mécanisme d'action

La pénétration des bactéries déposées sur l'oeil est obscure. Il y a, sans aucun doute, une lésion primitive de l'épithélium, puis phagocytose de la bactérie et transfert au ganglion régional avec une colonisation progressive du système lymphatique. Une partie de l'inoculum doit pénétrer par le canal lacrymal, puis la colonisation s'étend au ganglion symétrique au côté inoculé. Le ganglion parotidien en premier et moins fréquemment le sous-maxillaire hébergent le plus de bactéries. La voie conjonctivale correspondrait donc d'une certaine façon à une injection intralymphatique utilisée par ailleurs pour obtenir une importante réponse immune avec de faibles doses d'antigène.

Si ce mode de vaccination s'avérait efficace, il pourrait être utilisé en vue d'autres vaccinations.

Mais il était nécessaire pour poursuivre cette étude de juger du comportement des vaches gestantes à cette méthode vaccinale dont nous venons de définir les modalités.

C - EPREUVE SUR VACHES GESTANTES - SEROLOGIE ET IMMUNITE (5)

I. - Buts recherchés

A la lumière des résultats obtenus au cours des deux précédentes études, sont étudiées ici :

- la réponse sérologique des vaches à l'administration de 5×10^9 *Brucella abortus* par voie conjonctivale

a) soit après une primo-vaccination avec 9×10^{10} bactéries par voie sous-cutanée,
b) soit en deux vaccinations successives par voie conjonctivale ;

- la protection conférée par les deux méthodes de vaccination comparée à la vaccination standard sur vaches gestantes (une seule injection sous-cutanée).

II. - Matériel et méthodes

1. Plan expérimental

a) Composition des groupes pour l'étude des réponses sérologiques

74 génisses frisonnes provenant d'élevages indemnes de Brucellose et n'ayant aucun anticorps brucellique lors de deux examens successifs, furent réparties au hasard en quatre groupes quand elles avaient entre 7 et 12 mois :

- Groupe A : 8 génisses témoins,
- Groupe B : 19 génisses recevant la vaccination standard par voie sous-cutanée,
- Groupe C : 19 génisses recevant
  * la vaccination standard puis 6 mois après une vaccination par voie conjonctivale (groupe C_1)
  * la vaccination standard puis la vaccination conjonctivale 8 mois après (groupe C_2)
- Groupe D : 28 génisses recevant
  * 2 vaccinations conjonctivales à 6 mois d'intervalle (groupe D_1)
  * 2 vaccinations conjonctivales à 8 mois d'intervalle (groupe D_2) : instillation sur l'oeil droit.

En fait, cette distinction C_1-C_2 et D_1-D_2 est superflue puisque nous n'avons pas trouvé de différence par la suite.

b) Composition des groupes pour la mesure de protection

Les 74 génisses furent inséminées entre 15 et 20 mois. 24 vaches non gravides ou ayant dépassé le terme furent éliminées pour la seconde partie de l'expérimentation.

Le groupe A comprenait donc 7 animaux, le B : 12 animaux, le C : 12 animaux et le groupe D : 19 animaux. Ces 50 animaux furent placés dans l'étable étanche de la Station entre 4,5 et 6,5 mois de gestation et furent inoculés en déposant la dose infectante sur l'oeil gauche (15×10^6 *Brucella abortus* souche 544).

2. Vaccin utilisé

C'est celui décrit précédemment (cf. p. 9, § II.2.). Les concentrations furent étudiées de façon à avoir 9×10^{10} bactéries dans les 5 ml de la dose utilisée en sous-cutanée, et 5×10^9 bactéries dans 0,1 ml pour la vaccination conjonctivale en deux gouttes de 0,05 ml.

3. Examens de diagnostic

a) Sérologie

Des échantillons de sang furent prélevés le jour de la vaccination ou de la revaccination, chaque semaine sur un mois, chaque mois jusqu'à l'inoculation d'épreuve, puis toutes les 2 semaines jusqu'à la fin de l'expérience.

Les tests d'agglutination et de fixation du complément furent effectués par la méthode au Microtiter avec, pour référence, un sérum standard contenant 1.000 UI d'agglutinines par ml et fixant le complément à une dilution au 1/640, les titres d'agglutinines furent exprimés par le nombre de la dernière dilution donnant une réaction à 50 %, les nombres 1 correspondant à 1/10 ou 15 UI, 2 à 1/20 ou 30 UI. Les titres en fixation du complément furent exprimés par le nombre de la dernière dilution donnant au moins 50 % d'hémolyse, le chiffre 1 correspondant à 1/5. Le test au Rose Bengale fut également réalisé.

Un animal est considéré positif sérologiquement si son taux d'agglutinines est égal ou supérieur à 80 UI (= 100 % d'agglutination à une dilution au 1/40) ou s'il est égal ou supérieur à 1/5 en fixation du complément.

b) Réaction allergique

L'injection intradermique au niveau du pli caudal de 0,1 ml de brucelline fut réalisée deux mois, puis six mois après la primo-vaccination sur :

- 10 génisses du groupe B,
- 10 génisses du groupe C,
- 14 génisses du groupe D.

Une nouvelle injection fut réalisée deux mois après la seconde vaccination. Les réactions furent lues 72 heures plus tard par l'appréciation de l'épaississement du pli caudal et prirent des valeurs de 0 à 4 +.

c) Résultats cliniques

Les résultats des vêlages furent répartis ainsi :

T : veau vivant, à terme, au moins 264 jours de gestation ;

P : veau prématuré viable, avant terme ;

A : avortement, vêlage avant terme, foetus mort ou veau ne vivant que deux jours.

d) Examens bactériologiques

L'excrétion des *Brucella* fut recherchée par la mise en culture du colostrum et du mucus vaginal, récoltés dans les 4 jours suivant le part. La rate, les poumons et le contenu gastrique des foetus et des veaux morts à la suite de dystocie furent mis en culture pour la recherche de *Brucella*.

Les vaches furent abattues 6 semaines environ après la mise-bas. 29 ganglions et des morceaux d'organes furent récoltés, cultivés séparément et distribués. Chaque échantillon fut mis en culture sur un milieu WE. Après une incubation d'une semaine dans une atmosphère à 10 % de CO_2 et à 37°C, les colonies furent dénombrées. Le nombre de bactéries par gramme d'échantillon tissulaire fut calculé. Le nombre fut exprimé dans le tableau 8 comme suit :

0 : absence de *Brucella* ; 1 : < 5 bactéries/g ; 2 : de 5 à 24 bactéries ; 3 : 25 à 124 bactéries ; 4 : 125 à 624 bactéries ; 5 : > 625 bactéries.

Tableau 8 : Données sérologiques, cliniques et bactériologiques après expérimentation

(a) Tests de séro-agglutination effectués tous les 15 jours, marqués aux plus hautes dilutions positives avec 1 = 1/10 ou 15 UI et 2 = 1/20...
(b) Vêlage à x jours de gestation avec T : terme ($\geqslant$ 264 jours) ; P : prématuré vivant ; A : avortement
(c) *Brucella* isolées de V : mucus vaginal ; M : colostrum ; C : veaux (poumons, rate, contenu stomacal)
(d) Nombre de *Brucella* par gramme de tissu avec : pas d'indication = absence de *Brucella* ; 1 = de 1 à 4 bactéries ; 2 = de 5 à 24 ; 3 = de 25 à 124 ; 4 = de 125 à 624 ; 5 = > 625.
A : ganglion rétromammaire ; B : ganglion inguinal profond et iliaque ; C : ganglions sous-maxillaires, rétropharyngiens et parotidiens ; D : quartiers de mamelle ; E : ganglions précruraux ; F : rate ; G : ganglions préscapulaires ; H : ganglion médiastinal caudal ; I : utérus ; J : foie et reins
(e) DI : degré d'infection (nombre total d'infections sur 10 échantillons) ; NPS : nombre total d'échantillons positifs

N°	SAW(a)	(b)	(c)	(d) A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	DI	NPS (e)
A															
308	1 2 2 3 5 4 4 5 6 6 6	P 259	++	8	5	1		1						10	4
321	0 0 1 2 2 3 4 6 6	A 247	+++	4	3		5		1			2		15	5
323	0 1 2 2 2 2 3 3 5 5 5 5	T 281	++	3	2	2	4							11	4
340	1 1 4 4 3 6 7	A 180	+++	5	3		5	2			2	3		20	6
353	0 4 5 5 5 5 7 8 8	A 224	+++	4	3	2	4	3	1				1	18	7
358	0 1 1 2 4 6 8	A 236	+++	5	4		5		2		1			17	5
359	0 0 3 2 4 4 7 7 7	A 259	+++	5	2	1	5	5			1	5		24	7
B															
301	3 5 5 5 5 4 4 4 4	T 268	--											0	0
312	2 4 4 6 6 6 6 6 6 8 8 8 8	T 277	+++	5	2		5	3						15	4
316	2 3 3 4 3 3 3 3 2 2	A 259	+-											0	0
324	0 1 2 5 6 7 6 7 7	P 257	++	4			5							9	2
331	3 4 4 4 4 5 5 8	A 252	+++	5	3	3	5					3		19	5
341	2 3 3 3 2 3 7 7 6 6 6 4	P 249	++											0	0
344	0 1 1 2 4 5 5 6 7 7 6	A 242	+++	2			4	1						7	3
349	2 4 3 4 4 5 6 8 7	A 227	+++	5	3		5	3		2		1		19	6
356	2 3 3 3 3 2 3	T 270	+-		4	2		1			5	5	3	20	6
357	0 1 2 4 4 4 5 6 5 5	T 267	++	3			2	1				3		9	4
366	0 2 2 2 2 2 3 4 4 3 5 5 6	T 279	++	3	1		2							6	3
368	2 2 2 2 2 2 3 5 5 5	T 264	++	3			4	2				5		14	4

.../...

(suite tableau 8)

N°	SAW(a)	(b)	(c)	(d) A B C D E F G H I J	DI	NPS (E)
C						
307	3 3 2 3 2 2 2 2 1 1 2 2 1	T 273	--		0	0
310	2 3 4 4 4 4 5 5 5 4	T 275	++	3 5	8	2
314	1 2 2 3 2 3 4 5 4	A 251	+-+	3 3	6	2
327	3 4 4 4 4 4 4 4 4 3 4 3	T 280	--		0	0
328	2 2 2 3 4 5 6 5 7 6 6	A 254	+++	2 3 4	9	3
338	3 4 4 4 4 4 3 3 3 2 2 2	T 268	--		0	0
342	3 3 3 3 2 2 3	A 208	---		0	0
346	2 3 3 4 3 3 3 3 2 2 2	T 273	+-		0	0
350	0 1 2 4 5 6 7 7 7 7	A 263	+++	3 2 5	10	3
360	1 1 2 3 2 2 4 3 3 4 4 5 4	T 268	++	3 2 1 2	8	4
373	0 2 0 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0	T 276	--		0	0
374	1 1 2 2 2 2 1 1 1 0 2 0 0	T 280	--		0	0
D						
302	0 0 1 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0	T 270	---		0	0
317	0 1 1 2 1 1 2 1 0 0 0	T 271	+	3	3	1
319	0 2 2 2 2 2 3 3 2 4 6 6	T 279	-+	5 1 5 1	12	4
326	0 2 2 2 2 2 2 2 1 0 0	T 273	--		0	0
329	1 3 2 3 5 7 7 8 7 7	P 240	++	4 5 5	14	3
332	1 1 2 2 2 3 3 6 5	A 256	+++	3 1 3	7	3
333	0 1 1 1 1 2 1 1 1 0 0 0	T 280	--		0	0
334	0 3 3 4 5 4 5 4 4 4 4 3 4	T 283	-+		3	1
335	0 0 0 1 1 2 3 4 4 4	P 259	++	4 3 3 5	15	4
343	0 0 1 2 1 2 1 2 0 0 0	T 271	+		0	0
345	0 1 0 2 1 2 5 7 7	A 248	+++	5 4 1 5 1 2 2	20	7
348	0 1 1 2 0 0 1 1 0	T 267	++		0	0
351	0 1 1 2 2 1 1 1 0 0 1 0	T 273	--		0	0
352	0 0 1 2 1 2 2 2 2 3 3 3	T 272	-+	4 3	7	2
354	0 1 1 5 4 5 5 6 6 7	A 256	+++	5 5 4 5 2	21	5
362	0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 1 0 0	T 277	-+	3 1	4	2
363	0 2 2 4 5 6 6 5 6 6 5 5	T 272	++	4 5	9	2
370	0 1 2 2 6 5 6 7 6 7 7	T 276	++	5 5	10	2
371	0 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0	T 279	--		0	0

Le degré d'infection d'une vache fut la somme des nombres de bactéries issues des 10 échantillons de tissus (tableau 8).

Les échantillons de tissus furent stockés au congélateur après culture. Les tissus ne présentant aucune colonie dans la première culture furent réexaminés par la mise en culture supplémentaire de 4 échantillons et de l'utérus, chacun sur trois boîtes de Pétri.

L'absence d'infection fut de cette façon déterminée rigoureusement par l'absence de *Brucella* sur au moins 35 boîtes de Pétri par vache. De chaque animal infecté, au moins une colonie fut identifiée par agglutination sur lame, avec un sérum monospécifique, typage par phage, "dépendance au CO_2" et "uréase négative". Toutes les colonies isolées présentaient les caractéristiques de la souche 544.

III. - Résultats

1. Réponse sérologique après la vaccination

Après la vaccination standard, les génisses du groupe B ont une réponse sérologique typique. Les titres d'agglutinines atteignent 1.500 UI entre 15 jours et moins de 30 UI 7 mois plus tard.

Deux génisses, cependant, âgées de 8,5 ou 10,5 mois au moment de la vaccination, étaient encore positives 12 et 13 mois plus tard (tableau 9).

La vaccination conjonctivale 6 ou 8 mois après la vaccination standard (groupe C_1 et C_2) entraîne une augmentation des titres d'agglutinines et de fixation du complément de une ou deux dilutions pour deux à trois mois après la seconde vaccination (Fig. 4). Elles redeviennent négatives 6 mois plus tard, ce même délai étant nécessaire à la négativisation des génisses du groupe B. Donc, la vaccination n'allonge pas en soi la période durant laquelle les réactions post-vaccinales interfèrent avec le sérodiagnostic.

Après une primovaccination conjonctivale dans le groupe D (Fig. 5), le taux moyen d'agglutinines n'atteint pas 30 UI et il n'y a pratiquement pas de réponse à la fixation du complément et au Rose Bengale. Seulement 9 des 28

Tableau 9 : Nombre de génisses positives en sérologie (agglutininations et fixation du complément) après la primovaccination et la seconde vaccination. Entre parenthèses, le nombre de génisses par groupe

(*)	B (19)	C_1 (10)	C_2 (9)	C (total)	D_1 (14)	D_2 (14)	D (total)
0	00			0			0
1	19			19			0
2	19			19			1
3	19			19			0
4	19			19			2
6	19			19			9
8	19			19			3
12	19			19			0
16	19			19			0
20	10			10			0
24	11			10			0
28	10	6	4	10			0
29		7			0		
30		8			0		
31		8			3		
32	3	8	2	10	1	0	1
34		9			3		
36	2	3	0	3	0	0	0
37			1			0	
38			9			0	
39			8			4	
41	6	7	9	16	0	5	
44	1	2	1	3	0	3	3
50	2	2	1	3	0	0	0
53	2	2	0	2	0	0	0
58	1	1	0	1	0	0	0
61	0	1	0	1	0	0	0

(*) Semaines après la vaccination

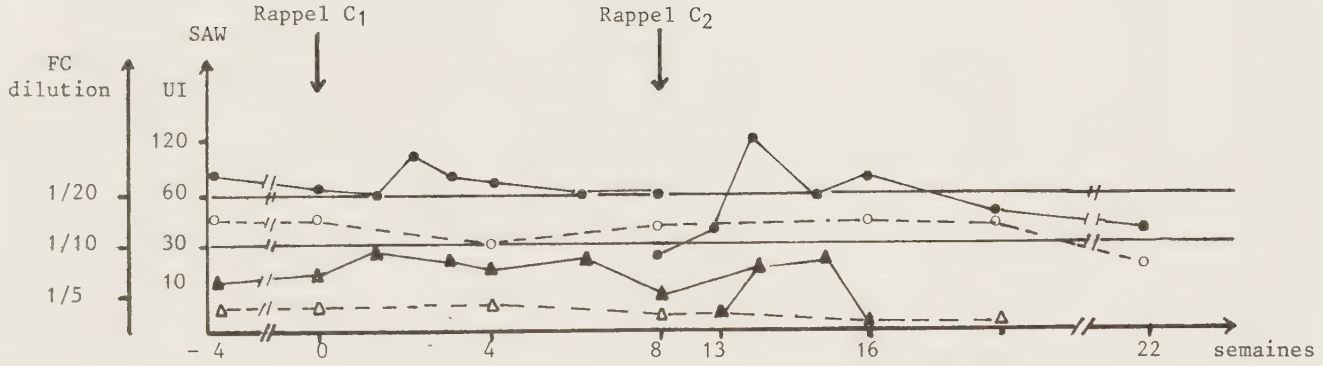

Fig. 4 : Moyenne géométrique des taux d'agglutinines et d'anticorps fixant le complément dans le groupe B, 6 mois après une vaccination sous-cutanée et dans le groupe C après une seconde vaccination par voie conjonctivale.

SAW ●—● Groupe C
o- - -o Groupe B

FC ▲—▲ Groupe C
△- - -△ Groupe B

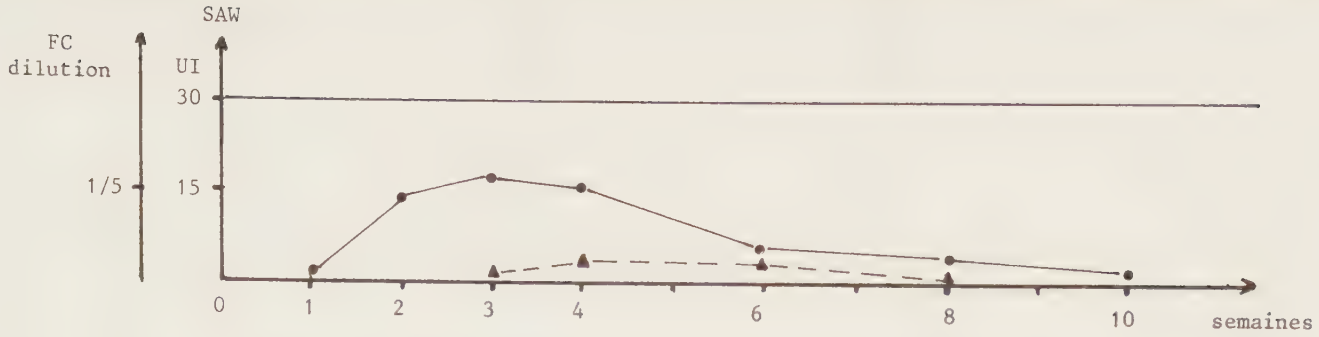

Fig. 5 : Moyenne géométrique des anticorps après la primo-vaccination conjonctivale dans le groupe D

SAW - FC

Fig. 6 : Moyenne géométrique des anticorps après la seconde vaccination conjonctivale dans le groupe D

SAW - FC

génisses furent positives temporairement (tableau 9). Après la seconde vaccination, le taux moyen d'agglutinines atteint 30 UI durant une semaine (fig. 6) ; la fixation du complément et le Rose Bengale sont encore négatifs pour la plupart. En tout, 10 génisses furent positives temporairement et seulement 8 gardèrent une sérologie positive pendant 8 semaines au maximum (tableau 9).

2. Hypersensibilité cutanée post-vaccinale

Deux mois après la vaccination, le test de la Brucelline fut positif pour 10 génisses sur 20, vaccinées par voie sous-cutanée (groupes B et C) et 3 sur 14 vaccinées par voie conjonctivale (groupe D). Dans deux cas, les réactions furent faibles (2 + et 1 +). Six mois après la primovaccination, seulement une génisse présentait une réaction faible (1 +). Deux mois après la vaccination par voie conjonctivale, deux des dix génisses avaient une réaction faible (1 +).

3. Mesure de protection (tableaux 8 et 10)

Du point de vue clinique, la proportion des veaux à terme fut la suivante : 1/7 dans le groupe A ; 6/12 pour B ; 8/11 pour C et 14/19 pour D (14 %, 50 %, 73 %, 74 % respectivement).

La génisse 342 du groupe C avorta au 208e jour de gestation. Aucune *Brucella* ne fut isolée à l'avortement ou au moment de l'abattage et la sérologie fut négative. Cet avortement n'étant pas brucellique, l'animal fut éliminé de l'analyse.

La durée moyenne de gestation par groupe fut :

- 240,8 jours pour A,
- 259,2 jours pour B,
- 269,2 jours pour C,
- 268,5 jours pour D.

Sur la totalité, la vaccination a un effet significatif sur le nombre d'animaux à terme et sur la durée de gestation.

Du point de vue de l'infection, l'efficacité de la vaccination peut être estimée de trois façons (tableau 10) :

1) absence d'infection, c'est-à-dire pas de *Brucella* sur aucun animal et à aucun moment ;

2) absence d'infection à l'abattage ;

3) niveau moyen d'infection par groupe à l'abattage, exprimé soit par le DI (degré d'infection), soit par le nombre d'échantillons positifs (NPS).

Tableau 10 : Protection après l'épreuve

(a) S/C : sous-cutanée ; C : vaccination conjonctivale
(b) 1 vache ayant avorté sans être infectée fut exclue

Groupe	Vaccination (a)	Naissance à terme/Total	Moyenne de durée de gestation (j)	Vaches infectées/Total			Moyenne du DI à l'abattage
				A l'accouchement	A l'abattage	Total infect.	
A	0	1/7	240,8	7/7	7/7	7/7	16,4
B	S/C	6/12	259,2	11/12	9/12	11/12	9,8
C	S/C + C	8/11(b)	269,2	6/12	5/12	6/12	3,4
D	C + C	14/19	268,5	14/19	12/19	14/19	6,5

Suivant la première estimation, le nombre de vaches indemnes de *Brucella* fut : 0/7 dans le groupe A ; 1/12 en B ; 6/12 en C ; 5/19 en D.

Suivant la deuxième estimation, le nombre d'animaux non infectés à l'abattage fut : 0/7 en A ; 3/12 en B ; 7/12 en C ; 7/19 en D.

Cinq vaches (316, 341, 346, 343, 348) qui excrétaient des *Brucella* à la mise-bas, se débarrassèrent de l'infection et aucune *Brucella* ne fut décelée à l'abattage, malgré des contrôles très rigoureux. Ceci fut confirmé par les données sérologiques. Pour trois vaches (316, 341, 346), le titre diminuait et pour deux (343, 348) dans le groupe D, le titre avait été négatif durant toute l'expérience.

Une vaccination de rappel par voie conjonctivale après primovaccination conjonctivale ou par voie sous-cutanée, confère une protection nettement meilleure qu'une seule vaccination. La vaccination par la méthode D donne une protection intermédiaire entre celle acquise par la vaccination standard (groupe B) et la méthode C. En fait, le degré d'infection du groupe D ne diffère pas significativement de celui du groupe B, ni du groupe C. Cependant, les méthodes C et D sont très supérieures aux autres du point de vue clinique.

IV. - Discussion

Dans cette série d'études, nous avons comparé trois méthodes de vaccination utilisant la souche vaccinale B 19, contre une infection expérimentale à l'aide de *Brucella abortus*, sur les cobayes d'abord, puis sur le bétail.

Les trois méthodes sont :

— Méthode B : vaccination standard, par injection sous-cutanée d'une simple dose de 7×10^4 *Brucella* sur le cobaye et 9×10^{10} sur les bovins.

— Méthode C : vaccination standard, suivie d'une seconde vaccination conjonctivale avec 10^7 *Brucella* sur le cobaye et 5×10^9 sur les bovins.

— Méthode D : deux vaccinations conjonctivales successives aux mêmes doses qu'en C.

La résistance conférée par ces méthodes de vaccination a été testée par inoculation d'une dose standard appropriée aux deux espèces, puis exprimée par :

- le nombre d'animaux protégés par rapport au nombre d'animaux inoculés ;
- le degré moyen d'infection par groupe ;
- le pourcentage de vaches à terme.

Les résultats sont analogues dans les deux espèces. La vaccination conjonctivale renforce très nettement l'immunité conférée par la vaccination standard. Deux vaccinations successives par voie conjonctivale entraînent une immunité intermédiaire entre celle de la vaccination standard et celle de la vaccination standard suivie d'un rappel.

Sur le bétail, le rappel par voie conjonctivale après la vaccination standard entraîne une réponse sérologique de faible intensité et de courte durée : en trois mois, les titres redeviennent identiques à ceux des animaux n'ayant pas eu de rappel.

La vaccination standard entraîne une certaine hypersensibilité cutanée de courte durée. Une primo ou seconde vaccination conjonctivale entraîne une très faible hypersensibilité sur un petit nombre d'animaux seulement.

Ainsi, à la suite de ces différentes expériences, il serait possible d'utiliser le vaccin B 19 suivant les méthodes C et D.

Avec la méthode C, on vaccinerait donc le bétail en primovaccination par la méthode standard (sous-cutanée avec 9×10^{10} bactéries), à l'âge de 4 à 6 mois, suivie d'un rappel par voie conjonctivale vers 10 à 15 mois. Les réactions post-vaccinales devraient disparaître entre 13 et 18 mois et beaucoup plus rapidement si la primovaccination se fait à 4 mois.

Les avantages de cette méthode sont importants : utilisation d'une primovaccination standard universellement adoptée ; bonne immunité sur les veaux et renforcement de l'immunité sur les adultes, sans créer de sérieuses difficultés pour l'interprétation des tests sérologiques.

La méthode D correspond à deux vaccinations conjonctivales. L'absence quasi totale de réactions sérologiques permet une grande latitude d'action quant à l'âge de vaccination. L'intervalle entre les deux inoculations devrait être de six mois, mais pourrait être de 12 à 14 mois sans trop d'inconvénients.

La primovaccination se ferait entre 4 et 10 mois et le rappel entre 10 et 18 mois. Tout ceci permettrait à un vétérinaire de se rendre dans un élevage deux fois par an, à 6 mois d'intervalle, et de vacciner les jeunes âgés de 4 à 16 mois.

Afin de donner plus de poids à ces résultats expérimentaux, une expérimentation sur une plus grande échelle fut entreprise, concernant les protocoles de vaccination C et D. Ces expériences et leurs résultats se trouvent donc consignés dans la partie suivante et permettent ainsi d'apporter des données supplémentaires.

D - COMPARAISON ENTRE DEUX METHODES DE VACCINATION (1)

Comme nous l'avons signalé, cette étude reprend sur une plus grande échelle le protocole de vaccination élaboré dans le chapitre précédent.

I. - Matériel et méthodes

1. Schéma expérimental

130 génisses frisonnes âgées de 6,5 mois à 9 mois furent achetées dans des élevages indemnes de Brucellose. Elles furent réparties au hasard en trois groupes :

- 11 non vaccinées ;
- 40 recevant dès leur arrivée 11,5 x 10^{10} UFC (Unités Formant Colonies) *Brucella abortus* B 19 par voie sous-cutanée ;
- 79 recevant 6,1 x 10^{9} UFC par voie conjonctivale.

Les 119 génisses vaccinées reçurent un rappel 6 mois plus tard avec 5,7 x 10^{9} UFC par voie conjonctivale.

Après insémination, entre l'âge de 14 à 16 mois, 50 génisses gravides furent choisies au hasard, 6 provenant du groupe des non vaccinées et 22 prises dans chacun des deux autres groupes. A environ 6 mois de gestation, elles furent isolées et reçurent une inoculation d'épreuve par voie conjonctivale de 14,8 x 10^{6} *Brucella abortus* souche 544 sur l'oeil gauche (la vaccination conjonctivale s'effectuant sur l'oeil droit).

Les vaccins et les suspensions d'épreuve furent préparés comme décrit précédemment.

2. Examens sérologiques

Des prises de sang furent effectuées avant et au moment de la vaccination, une fois par semaine sur un mois, puis chaque mois jusqu'à l'épreuve. D'autres prises de sang furent faites chaque 15 jours suivant l'épreuve jusqu'à la fin de l'expérience.

Agglutination et fixation du complément furent réalisées par la méthode du Microtiter comparées à un sérum standard. Les résultats en agglutination furent exprimés soit en UI/ml ou comme la moyenne géométrique du titre, c'est-à-dire le numéro d'ordre de la plus grande dilution donnant une réaction à 50 % (1 = 1/10 ; 2 = 1/20...) pour un groupe d'animaux. Un animal dont la sérologie présentait en agglutination 80 UI/ml (c'est à dire 100 % à la dilution au 1/40) et/ou en fixation du complément un titre au 1/5 ou plus, était considéré positif.

3. Résultats cliniques

Les mises-bas furent classées ainsi :

T : naissance à terme avec un veau vivant (au moins 264 jours de gestation,

P : veau prématuré mais vivant (avant 264 jours),

A : avortement, veau mort ou ne vivant que deux jours.

4. Examens bactériologiques

A la mise-bas, des cultures furent effectuées à partir du mucus vaginal et du colostrum, des échantillons de rate, poumons et contenu gastrique des avortons. Les génisses furent abattues six mois après la mise-bas. Vingt-neuf ganglions et morceaux d'organes furent récoltés, cultivés séparément et distribués en dix échantillons comme indiqué dans le tableau 14. Chaque échantillon fut mis en culture sur un milieu WE. Après une incubation d'une semaine dans une atmosphère à 10 % de CO_2 et à 37°C, les colonies furent dénombrées. Le nombre de colonies par gramme fut exprimé ainsi :

- 0 = pas de *Brucella*
- 1 = moins de 5
- 2 = 6 à 25
- 3 = 25 à 125
- 4 = 126 à 625
- 5 = > 625

Les nombres de 0 à 5 représentent le degré d'infection (DI) de chaque échantillon. Le DI d'une vache est la somme des DI des dix échantillons.

Les échantillons tissulaires furent stockés à - 20°C après culture. Quand aucune *Brucella* ne fut décelée, l'échantillon fut de nouveau mis en culture sur cinq boîtes de milieu de Farrel (ce milieu, moins inhibiteur que le

WE, permet un taux d'isolement comparable à celui obtenu par inoculation du cobaye).

5. Analyses statistiques

X^2 et analyse de variance furent utilisés.

II. - Résultats

1. Réponse sérologique après vaccination

Après une primovaccination par voie sous-cutanée (S), la vaccination par voie conjonctivale (C) produit ou non une très faible augmentation des titres d'agglutinines (Fig. 7). Quelques génisses eurent des anticorps fixant le complément, la proportion des animaux positifs avant et après le rappel passant respectivement de 15 à 30 % (Fig. 8).

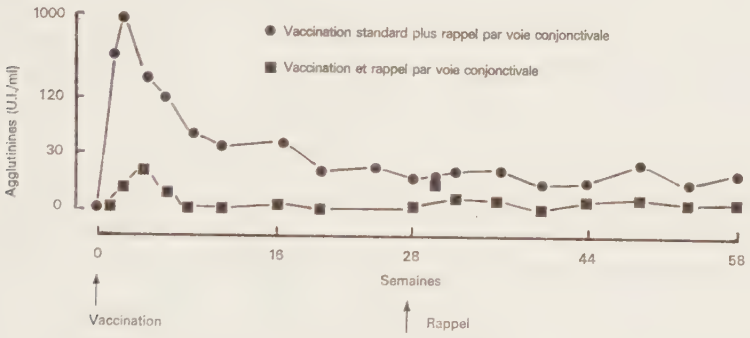

Fig. 7 : Moyenne géométrique des agglutinines après vaccination primaire et rappel

Cette augmentation du nombre de vaches positives en fixation du complément cessant au bout de douze semaines, le nombre d'animaux encore positifs était le même que celui observé avec une simple vaccination sous-cutanée, par la suite. Toutes les génisses étaient négatives 58 semaines après la primovaccination.

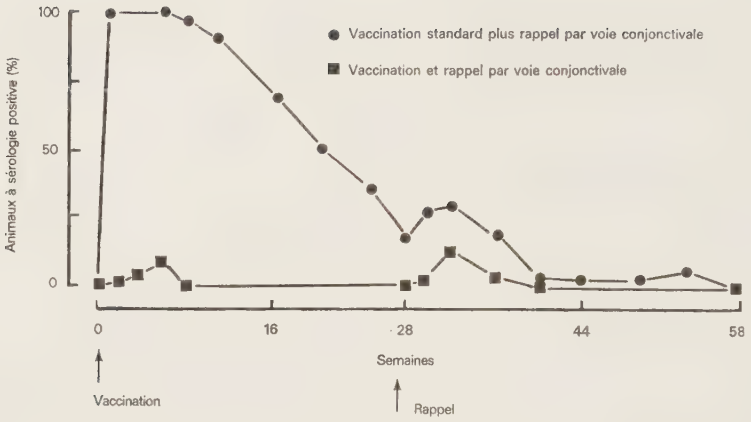

Fig. 8 : Proportion d'animaux positifs en sérologie après vaccination et rappel

La primovaccination conjonctivale et le rappel donnèrent une réponse en agglutination inférieure à 30 UI/ml. Environ 10 % des génisses eurent des anticorps fixant le complément après la primovaccination et 15 % après le rappel. Douze semaines plus tard, toutes les vaches furent négatives.

2. Protection

Les génisses vaccinées de tous les groupes eurent un taux de mise-bas à terme ($P \leqslant 0,01$), une durée de gestation ($P \leqslant 0,01$) significativement meilleurs que celui des génisses témoins et d'autre part, excrétaient moins de *Brucella* que les témoins. En tout, 36 % des génisses vaccinées furent totalement protégées contre l'infection, c'est-à-dire qu'aucune *Brucella* ne fut mise en évidence à la mise-bas ou à l'examen *post mortem*.

Dans chacun des groupes vaccinés, les résultats cliniques et bactériologique ne furent pas très différents et la protection totale fut la même (tableaux 11 à 17).

Cependant, à l'examen *post mortem* les génisses vaccinées (S + C) furent infectées à un degré moindre que les génisses (C + C), qui furent infectées au même degré que les témoins.

Tableau 11 : Résultats cliniques et bactériologiques après inoculation dans le groupe témoin

(a) T : à terme ; P : prématuré ; A : avortement
(b) V : mucus vaginal ; C : colostrum ; F : foetus
(c) DI : degré d'infection (cf tableau 14)

Animaux	Résultats cliniques		Résultats bactériologiques			
	Naissance(a)	Durée de gestation (j)	*Brucella* isolée de (b) V	C	P	DI à l'abattage(c)
462	A	229	+	+	+	6
470	P	263	+	+		0
471	A	240	+	+	+	19
475	T	281	+	+	+	11
481	A	232	+	+	+	27
586	T	278	-	-		0

Tableau 12 : Résultats cliniques et bactériologiques après inoculation dans le groupe de génisses recevant deux vaccinations conjonctivales

(a) T : à terme ; P : prématuré ; A : avortement
(b) V : mucus vaginal ; C : colostrum ; F : foetus
(c) DI : degré d'infection (cf. tableau 14)

Animaux	Résultats cliniques		Résultats bactériologiques			
	Naissance(a)	Durée de gestation (j)	*Brucella* isolée de (b) V	C	F	DI à l'abattage(c)
468	P	257	+	+		21
469	T	278	-	-		0
472	T	287	-	-		0
474	T	276	-	-		0
482	A	238	+	+	+	42
484	T	283	-	-		0
493	T	279	-	-		4
494	P	247	+	+		20
495	T	285	-	-		4
498	P	253	+	+		31
560	T	275	+	+		2
571	T	280	-	-		0
573	T	276	-	-		0
576	T	275	+	+		9
582	T	286	-	-		0
584	T	282	-	+		0
588	T	290	-	+		11
590	A	258	+	+	+	34
594	T	274	-	-		0
615	T	264	+	+		25
616	T	280	-	+		1
617	A	264	+	+	+	28

Tableau 13 : Résultats cliniques et bactériologiques après inoculation dans le groupe de génisses recevant une vaccination S/C + C

(a) T : à terme ; A : avortement
(b) V : mucus vaginal ; C : colostrum ; F : foetus
(c) DI : degré d'infection (cf. tableau 14)

Animaux	Résultats cliniques		Résultats bactériologiques			
	Naissance(a)	Durée de gestation (j)	*Brucella* isolée de (b) V	C	F	DI à l'abattage(c)
465	T	284	–	–		0
467	T	281	–	–		0
478	T	277	–	–		0
479	T	278	+	+		7
486	A	234	+	+	+	12
487	T	280	+	+		0
488	A	210	+	+	+	15
489	T	282	–	–		0
492	T	269	–	+		11
499	T	269	–	–		6
565	T	272	–	–		0
566	T	275	–	–		2
569	T	274	+	+		6
575	A	246	+	+		24
585	T	281	–	–		0
587	T	280	–	–		0
589	T	274	+	+		0
608	T	282	+	–		0
609	T	277	–	–		1
611	T	277	–	–		0
614	T	281	–	+		2
620	T	279	–	–		1

Tableau 14 : Données bactériologiques à l'examen *post mortem* dans le groupe témoin

(a) Nombre de *Brucella* par gramme de tissu avec : pas d'indication = absence de *Brucella* ; 1 = de 1 à 4 bactéries ; 2 = de 5 à 24 ; 3 = de 25 à 124 ; 4 = de 125 à 624 ; 5 = > 625
A : ganglion rétromammaire ; B : ganglions iliaques ; C : ganglion sous-maxillaire, parotidien et rétropharyngien ; D : quartier de la mamelle ; E : ganglion subiliaque précrural ; F : rate ; G : ganglions préscapulaires ; H : ganglion médiastinal ; I : utérus ; J : foie + reins

Animaux	Nombre de *Brucella* isolées de (a)										DI
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
462		1	1	3			1				6
470											0
471	4	1	2	5	2		1		4		19
475	4	1		3	2		1				11
481	5	4	5	5	3	1	2		2		27
586											0

Tableau 15 : Données bactériologiques à l'examen *post mortem* dans le groupe de génisses recevant deux vaccinations conjonctivales

(a) Nombre de *Brucella* par gramme de tissu avec : pas d'indication = absence de *Brucella* ; 1 = de 1 à 4 bactéries ; 2 = de 5 à 24 ; 3 = de 25 à 124 ; 4 = de 125 à 624 ; 5 = > 625
A : ganglion rétromammaire ; B : ganglions iliaques ; C : ganglion sous-maxillaire, parotidien et rétropharyngien ; D : quartier de la mamelle ; E : ganglion subiliaque précrural ; F : rate ; G : ganglions préscapulaires ; H : ganglion médiastinal ; I : utérus ; J : foie + reins

Animaux	Nombre de *Brucella* isolées de (a)										DI
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
468	5	2		5	3			1	3	2	21
469											0
472											0
474											0
482	5	5	5	5	5	5	3	4	3	2	42
484											0
493									4		4
494	5	2	3	4	1	1	1	1	2		20
495									4		4
498	5	4	4	5	2	3	2	2	5	3	31
560		1							1		2
571											0
573											0
576	4			5							9
582											0
584											0
588	4	1		5			1				11
590	5	2	2	5	2	2	3	4	5	4	34
594											0
615	5	5	2	5	4	1		1	1	1	25
616							1				1
617	5	5	5	5	4	2	1		1		28

Tableau 16 : Données bactériologiques à l'examen *post mortem* dans le groupe de génisses recevant une vaccination S/C + C

(a) Nombre de *Brucella* par gramme de tissu avec : pas d'indication = absence de *Brucella* ; 1 = de 1 à 4 bactéries ; 2 = de 5 à 24 ; 3 = de 25 à 124 ; 4 = de 125 à 624 ; 5 = > 625
A : ganglion rétromammaire ; B : ganglions iliaques ; C : ganglion sous-maxillaire, parotidien et rétropharyngien ; D : quartier de la mamelle ; E : ganglion subiliaque précrural ; F : rate ; G : ganglions préscapulaires ; H : ganglion médiastinal ; I : utérus ; J : foie + reins

Animaux	Nombre de *Brucella* isolées de (a)										DI
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
465											0
467											0
478											0
479	1						1		5		7
486	4	1		4					3		12
487											0
488	4	3	1	3		1			3		15
489											0
492	5	2		4							11
499	4	2									6
565											0
566					2						2
569						1			5		6
575	5	4	3	5	2	1		2	2		24
585											0
587											0
589											0
608											0
609					1						1
611											0
614	2										2
620								1			1

Tableau 17 : Comparaison de la protection à l'inoculation par deux méthodes de vaccination

(a) C + C : 2 vaccinations conjonctivales successives
S/C + C : vaccination par voie sous-cutanée suivie d'un rappel conjonctival
(b) moyenne des DI

(a)	Nombre animaux	Vêlages à terme (%)	Gestation*	Isolation de *Brucella*			Protection (%)	DI moyen (b)
				Mucus vaginal	A l'abattage	Total		
Non	6	2 (33)	254,0	5	4	5	16,6	10,5
C + C	22	16 (73)	272,1	9	13	14	36,4	10,5
S/C + C	22	19 (86)	271,0	8	11	14	36,4	3,9

* Durée moyenne en jours

Tableau 18 : Comparaison de la protection à l'inoculation par 3 méthodes de vaccination (résultats de deux expérimentations successives)

(a) S : vaccination standard par voie sous-cutanée
(b) Moyenne des DI
(c) Une vache avorta mais ne fut pas reconnue brucellique

(a)	Nombre animaux	Vêlages à terme (%)	Gestation*	Isolation des *Brucella*			Protection (%)	DI moyen (b)
				Mucus vaginal	A l'abattage	Total		
Non	13	3 (23)	246,7	12	11	12	7,6	13,7
S	12	6 (50)	259,2	11	9	11	8,3	9,8
C + C	41	30 (73,2)	270,4	19	25	28	31,7	8,7
S + C	34	27/33(c) (81,8)	270,4	14	16	20	41,2	8,7

* Durée moyenne en jours

Deux des six témoins ne furent pas infectés à l'abattage : la première (585), mis à part une positivité à la fixation du complément, ne fut jamais découverte infectée après chaque examen ; la seconde (470) eut une forte réponse sérologique et excréta des *Brucella* lors d'un vêlage prématuré, mais aucune ne fut décelée à l'examen *post mortem*.

III. - Discussion

Comme cette expérience suit le même plan de l'expérimentation précédente, et que les résultats sont statistiquement homogènes dans chaque groupe correspondant, en particulier les DI à l'abattage (contrôles : $F = 1,47$; groupe C + C : $F = 2,06$; groupe S + C : $F = 0,02$ pour $F \leqslant 4,08$ au niveau de signification de $P = 0,05$), il est donc possible de regrouper les données de toutes les expérimentations (tableau 18).

Dans la première expérience, une vaccination standard sous-cutanée conférait une faible protection. Les résultats cliniques étaient meilleurs que ceux des témoins ($P \leqslant 0,05$), mais seulement une génisse sur 12 était complètement protégée. Au contraire, un rappel par voie conjonctivale après une primovaccination sous-cutanée ou conjonctivale, entraînait une différence significative quant au nombre de vêlages à terme ($P \leqslant 0,001$), à l'excrétion de *Brucella* au vêlage ($P \leqslant 0,001$) et à la protection complète ($P \leqslant 0,05$) par rapport aux témoins. Les mêmes différences furent observées quand les génisses (S + C) et (C + C) furent comparées aux génisses vaccinées par voie sous-cutanée, mais elles se révélèrent moins significatives ($0,05 < P < 0,01$). A l'abattage, les génisses (S + C) furent infectées à un degré moindre par rapport aux témoins ($P \leqslant 0,01$) et aux génisses (C + C) ($P \leqslant 0,05$).

La meilleure protection est obtenue par une vaccination (S + C) meilleure que la vaccination (C + C), elle-même meilleure que la vaccination standard.

En conclusion, on peut recommander deux schémas de vaccination :

— Dans les zones à faible infection, la vaccination (C + C) devrait être utilisée, l'écart entre la primovaccination et le rappel pouvant être de

six mois, mais pouvant être aussi étendu à douze mois ou raccourci à quatre mois, suivant les contraintes de l'élevage (par exemple la primovaccination pourrait être faite entre 3 et 9 mois et le rappel entre 9 et 15 mois).

— Dans les zones fortement infectées, la méthode (S + C) pourrait être utilisée afin d'apporter un haut niveau d'immunité. La primovaccination se ferait entre 3 et 6 mois, le rappel 6 mois plus tard ou à n'importe quel moment, même sur des vaches adultes pour renforcer l'immunité. Le dépistage sérologique ne serait perturbé que pendant les trois mois suivant le rappel.

Ainsi, au cours de cette première partie, un mode original de vaccination a pu être mis au point après de nombreuses expériences rigoureuses et concluantes au vu des résultats obtenus. Il restait à confirmer tout cela en appliquant ces méthodes à des troupeaux variés et sur des terrains différents. C'est ce qui est rapporté dans la partie suivante.

DEUXIEME PARTIE

APPLICATION DE LA METHODE SUR LE TERRAIN

La vaccination avec *Brucella abortus* souche 19 par voie conjonctivale en rappel sur une vaccination primaire soit par voie sous-cutanée, soit par voie conjonctivale, a été réalisée dans les troupeaux suivants, où sévissait la Brucellose :

Domaine de Marcenat	15330 MARCENAT
Domaine de Bois vernois	39120 VOITEUR
Domaine des Razats	63820 LAQUEUILLE
Domaine de la Minière	78350 JOUY-en-JOSAS
Domaine de la Verrerie	81400 CARMAUX
Domaine du Joly	88500 MIRECOURT

Vaccin et vaccination

La souche 19 utilisée a été préparée et lyophilisée, soit à la Station I.N.R.A. de Nouzilly (lots AMP_1 et AMP_2, soit à l'Institut Mérieux (lot 7 GB 144). Les lots AMP_1 et AMP_2 ont été utilisés du printemps 1976 au printemps 1978, le vaccin Mérieux au printemps et à l'automne 1978. Deux fois par an, avant chaque campagne d'utilisation, un dénombrement de germes vivifiables a été fait de façon à ce que chaque animal reçoive la dose prescrite (5×10^9) en deux gouttes sur la conjonctive de l'oeil gauche au printemps, de l'oeil droit à l'automne.

Le vaccin des lots AMP_1 et AMP_2 présenté en ampoules scellées a été remis en suspension en solution NaCl à 8,5 % et distribué avec un compte-gouttes en verre (goutte de 50 µl). Le vaccin Mérieux, présenté en flacon fermé par un bouchon de caoutchouc est distribué à l'aide d'un compte-gouttes en plastique s'adaptant sur le goulot du flacon et distribuant des gouttes de 33 µl. Ce dernier système est d'un emploi plus pratique et moins dangereux que le compte-gouttes en verre.

On trouvera donc dans cette partie les données concernant chaque troupeau avec l'historique de la Brucellose et les résultats enregistrés, les discussions et les remarques que ces résultats appellent.

A - DOMAINE DE MARCENAT (15330 Marcenat)

Responsable : J.P. GARREL
Vétérinaire sanitaire : Dr. MONTEIL - Condat-en-Ferriers

I. - Composition et conduite du troupeau

Le troupeau se compose d'environ 300 femelles de plus d'un an, de race Sallers, Frisonne, Charolaise, Montbéliarde et de vaches croisées. Le troupeau dépend de l'I.N.R.A. (Département de l'Elevage des Ruminants de Theix) qui y poursuit des expérimentations zootechniques.

Le troupeau est réparti dans différentes étables situées sur le Domaine de Marcenat, et dans des fermes (Ronzaine, Laudeyrat, La Borie), situées dans un rayon de 9 kilomètres. Les animaux hibernent en stabulation entravée, sauf les génisses qui sont alors en stabulation libre.

Les animaux consomment du foin, de l'ensilage (maïs, herbe), des compléments (grains, tourteaux) et des condiments minéraux. Les vaches allaitantes passent l'été à la montagne et les vaches traites vont dans les pâturages situés près du domaine.

II. - Historique de la Brucellose et actions sanitaires et médicales entreprises

La Brucellose sévissait depuis longtemps dans ce domaine. En 1970-1971, une flambée d'avortements eut lieu que ni les vaccinations antérieures, avec le B 19, ni l'abattage des vaches ayant avorté les années précédentes, n'ont pu éviter. De nombreux animaux ont alors une sérologie positive et le nombre des vaches réellément infectées est certainement de beaucoup supérieur à celui des réagissantes en sérologie.

L'échec de la prophylaxie antérieure, la valeur génétique et expérimentale des animaux contaminés ont amené à concevoir une stratégie conservatrice basée sur :

1) L'abandon pour quelques années de la prophylaxie sanitaire, l'élimination des animaux infectés se faisant progressivement par le jeu des réformes habituelles.

2) Vaccination de tous les animaux avec le vaccin H 38.

3) Retour à la prophylaxie sanitaire lorsque l'amélioration de l'état sanitaire sera telle que cette prophylaxie puisse être mise en oeuvre de façon économique et avec des espoirs raisonnables de succès. Il était prévu que cette opération finale se ferait sous couvert d'une vaccination ne perturbant pas le dépistage sérologique et qu'elle devrait achever l'assainissement du troupeau.

Pour la majorité des animaux qui le reçoivent en rappel, le H 38 provoque l'apparition d'anticorps pouvant persister plusieurs années. Il a donc fallu suivre l'évolution de l'infection uniquement par l'analyse des résultats cliniques et bactériologiques (bactérioscopie à la D.S.V. du Cantal et recherche des *Brucella* par culture à partir d'écouvillons vaginaux et de colostrum à l'I.N.R.A. de Nouzilly).

Dès 1975-1976, l'état sanitaire s'était notablement amélioré. Il était prévisible que cette amélioration se confirmerait par la suite. Il était alors possible de commencer la phase finale de l'intervention, en arrêtant la

vaccination au H 38 pour revenir à la prophylaxie sanitaire. La vaccination au B 19 par voie conjonctivale ayant été expérimentée auparavant (cf. Chap. A, B, C, D - Première Partie), elle fut appliquée sur la moitié des génisses, l'autre moitié recevant toujours du H 38. Ceci permettait de conserver une certaine prudence et de comparer l'efficacité de chacune des deux vaccinations.

III. - Etat vaccinal actuel des animaux

Les vaches adultes ont reçu une injection annuelle de H 38 pendant quatre années consécutives, de 1971 à 1974. Les génisses nées en 1970-1971 et depuis, ont reçu trois injections de H 38. La première à l'âge de 4 à 6 mois, la seconde deux mois plus tard et la dernière vers 16 à 18 mois. Les premières génisses ainsi vaccinées ont vêlé pour la première fois en 1973-1974.

A partir de 1975, la moitié des génisses ont reçu du H 38 comme précédemment et l'autre moitié du B 19 par voie conjonctivale, la dernière instillation étant faite à l'âge de 4 à 6 mois, la seconde six mois plus tard. Les premières génisses vaccinées au B 19 ont vêlé pour la première fois en 1977-1978.

IV. - Résultats

On a pu observer une diminution progressive du nombre des avortements et de celui des vaches excrétrices de *Brucella* (tableaux 19 et 20).

Deux examens sérologiques ont été pratiqués : le premier en avril 1978 sur le sérum de 86 génisses vaccinées en 1976 et le second en décembre 1978 sur 292 femelles alors présentes dans les étables. Les résultats sont résumés par les tableaux 21 et 22.

Ainsi, du fait de l'amélioration de l'état sanitaire et de la nécessité de remettre en oeuvre la prophylaxie sanitaire pour terminer l'assainissement du troupeau, il a été décidé d'arrêter l'utilisation du H 38 et de vacciner à partir de l'automne 1978 la moitié des génisses au B 19 administré deux fois par voie

Tableau 19 : Résultats cliniques : nombre d'avortements et pourcentage par rapport au nombre de mise-bas

Années	Vaccinations antérieures*	Primipares	Multipares	Total
1969-1970	Mp et Pp : B 19	1/72 (1,5)	0/195	1/267 (0,4)
1970-1971	Mp et Pp : B 19	29/64 (45)	7/225 (3)	36/289 (12)
1971-1972	Mp : B 19 + 1 inj. de H 38 Pp : B 19	18/72 (25)	17/209 (8)	35/281 (12)
1972-1973	Mp : B 19 + 2 inj. de H 38 Pp : B 19 + 1 inj. de H 38	12/85 (14)	18/237 (8)	30/322 (9)
1973-1974	Mp : B 19 + 3 inj. de H 38 Pp : B 19 + 2 inj. de H 38 Pp : H 38 (3 inj.)	1/19 (5,2) 2/33 (6)	19/256 (7,4)	22/308 (7,1)
1974-1975	Mp : B 19 + 4 inj. de H 38	0/64	13/249 (5,2)	13/313 (4,1)
1975-1976	Mp : B 19 + 4 inj. de H 38 Pp : H 38 (3 inj.)	7/58 (12)	3/215 (1,4)	10/273 (3,6)
1976-1977	Mp : B 19 + 4 inj. de H 38 Pp : H 38 (3 inj.)	0/74	3/215 (1,4)	3/289 (1)
1977-1978	Mp : B 19 + H 38 Pp : H 38 Pp : B 19 par voie conjonctivale	2/73 (2,7) 0/5	6/224 (2,7)	8/302 (2,6)

* Mp : multipares - Pp : primipares

Tableau 20 : Résultats bactériologiques : nombre de vaches ayant excrété des *Brucella*/nombre de prélèvements utilisables et pourcentage

(a) Primipares âgées de 3 ans ayant reçu une injection de B 19 et deux de H 38
(b) Primipares âgées de 2 ans ayant reçu trois injections de H 38

Années	Primipares	Multipares	Total
1973-1974	(a) 2/21 (9,5) (b) 1/31 (3,2)	26/256 (10,1)	29/308 (9,4)
1974-1975	4/64 (6,2)	28/234 (11,9)	32/298 (10,7)
1975-1976	2/52 (3,8)	18/185 (9,7)	20/237 (8,4)
1976-1977	0/74	2/215 (0,9)	2/289 (0,6)
1977-1978	0/78	0/220	0/298

Tableau 21 : Résultats sérologiques (avril 1978)

Nombre de génisses	Vaccin	Résultats positifs	Résultats négatifs
45	B 19	0	45
41	H 38	28	13

Tableau 22 : Résultats sérologiques (décembre 1978)

Nombre de vaches	Vaccin	Résultats positifs	Résultats négatifs
33	B 19	0	33
259	H 38	172	87

conjonctivale, l'autre moitié étant d'abord vaccinée par voie sous-cutanée et recevant un rappel par voie conjonctivale six mois plus tard.

Cette expérimentation montre qu'il est possible d'obtenir économiquement sinon l'assainissement du troupeau, du moins une amélioration considérable de l'état sanitaire par le seul jeu des réformes habituelles et une vaccination efficace des génisses, rendant ensuite la prophylaxie sanitaire elle-même efficace et économique.

Il a donc été possible à partir de ce résultat, d'utiliser le B 19 dans les cinq autres troupeaux au lieu du H 38 initialement utilisé à Marcenat.

B - DOMAINE DES RAZATS (63820 Laqueuille)

Responsable : Mr. BONY
Vétérinaire Sanitaire : Dr. BERTRAND - 63950 St-Sauves-d'Auvergne

I. - Composition et conduite du troupeau

Le domaine appartient à l'I.N.R.A. et dépend du Département de l'Elevage. Le troupeau comprend environ 200 femelles de plus d'un an, dont environ 70 de race Charolaise, 90 de race Salers et 40 croisées. Pendant l'hiver, ces animaux sont répartis dans deux étables séparées par un hangar à fourrage.

Etable 1 : 55 vaches en stabulation entravée sur fosse à lisier et 60 génisses en stabulation libre ;

Etable 2 : 70 vaches en stabulation libre (aire cimentée paillée, fosse à lisier), le reste des animaux étant en stabulation libre sur terre battue paillée.

Pendant l'été, les animaux sont dans les prairies de montagne.

Les animaux consomment du foin et de l'ensilage (maïs, herbe). La complémentation est assurée par du maïs grain, de l'orge, des tourteaux (arachide, soja).

II. - Historique de la Brucellose et des actions sanitaires et médicales entreprises

La Brucellose est apparue dans le troupeau dès la première campagne de vêlage, en 1964-1965 à Theix. Il était alors composé de 75 Salers achetées à l'âge de deux ans dans le Cantal l'année précédente avec les garanties sanitaires usuelles (séro-agglutination d'achat négative et vaccination au 45/20 à l'arrivée. Depuis 1965, la Brucellose s'est manifestée chaque année par des avortements (3 % des animaux gestants, en moyenne) et des sérologies positives.

En 1966, à la suite des deux premières campagnes (5 avortements pour 67 gestantes en 1965, 7 pour 46 gestantes en 1966), il a été décidé en accord avec la D.S.V. du Puy-de-Dôme de n'abattre que les animaux ayant avorté ou présentant un titre brucellique supérieur à 80 UI/ml aux épreuves sérologiques (22 positives sur 57 en 1966).

La vaccination au B 19 des femelles âgées de 4 à 6 mois a toujours été effectuée depuis 1965, de même que les épreuves annuelles de dépistage.

De 1966 à 1965, il a été introduit en moyenne chaque année 30 génisses (de 16 à 60) âgées de 9 à 30 mois et d'origines très diverses : exploitations du Cantal, de l'Aveyron, ou du Centre (Nièvre, Allier, Saône et Loire) ; domaine de l'I.N.R.A.-Marcenat, du Pin ou de Tours ; troupeau de la Clé du Lac (Puy-de-Dôme) et troupeau Aubrac de Theix. Tous les animaux introduits ont présenté des résultats négatifs aux tests sérologiques d'achat, bien que certains aient été issus de troupeaux reconnus infectés (Clé du Lac, Aubrac de Theix).

En 1972, une vaccination au H 38 a été effectuée (une seule injection sur des animaux sérologiquement négatifs). Toutefois, des rappels n'ont pu être faits (la D.S.V. n'ayant pas donné son accord). A la suite de cette vaccination, le dépistage sérologique a été remplacé par le prélèvement et la mise en culture, soit de mucus utérin, soit de colostrum. Les animaux reconnus infectés ont été abattus (3 en 1974 ; 2 en 1975 ; 3 en 1976 ; 1 en 1977 ; 1 en 1978).

En 1975, à la suite d'une forte recrudescence de la Brucellose (17 avortements plus 14 mise-bas prématurées soit 20 % des femelles gestantes), un protocole d'éradication a été élaboré en accord avec le C.R.V.Z. de Tours et la

D.S.V. du Puy-de-Dôme (dépistage sérologique, utilisation du vaccin *B. melitensis* Aborstop non agglutinogène de Roger Bellon, interdiction de monter les animaux infectés en estive, élimination des animaux infectés vers 1978-1979).

En avril 1978, un nouveau protocole a été élaboré à la suite de la mise en place par le nouveau Directeur des Services Vétérinaires du département d'un plan d'éradication de la Brucellose (dépistage sérologique, vaccination des génisses au B 19 en deux inoculations conjonctivales, abattage des animaux reconnus infectés par la sérologie ou la bactériologie).

Vaccinations antibrucelliques : situation en début 1979

1) Animaux nés entre 1965 et 1970 (n° 65001 à 70533)
   - B 19 sous-cutané à 6 mois, plus une injection de 45/20 (Néobrucel)
   - une injection de H 38 en 1972
   - trois injections d'un vaccin non agglutinogène composé de *B. melitensis* tuées (Aborstop, R. Bellon) en 1975

2) Animaux nés entre 1971 et 1974 (achetés ou nés au Domaine, n° 71120 à 74423)
   - B 19 sous-cutané à 6 mois
   - trois injections d'Aborstop

3) Animaux nés en 1974 et 1975 (nés au Domaine, n° 74554 à 75517)
   - B 19 sous-cutané à 6 mois
   - rappel par voie conjonctivale six mois plus tard

4) Animaux nés en 1975 (achetés, n° 75450 à 75474)
   - trois injections d'Aborstop

5) Animaux nés depuis fin 1975 au Domaine (à partir de 75577)
   - B 19 en deux inoculations conjonctivales

III. - Résultats

Le nombre des avortements brucelliques est en très forte diminution.

Les résultats des trois derniers examens sérologiques montrent (tableau 23) :

- un taux élevé d'infection parmi les animaux âgés, achetés ou nés au Domaine jusqu'en 1975, quelles qu'aient été les vaccinations pratiquées ;
- un taux très faible d'infections parmi les animaux nés au Domaine depuis 1975 et vaccinés au B 19 par voie conjonctivale.

L'élimination des animaux reconnus infectés a commencé et le troupeau va être soumis à la prophylaxie sanitaire totale.

Tableau 23 : Résultats de trois examens sérologiques - Domaine des Razats, Laqueuille (D.S.V. du Puy-de-Dôme)

Origine des animaux	Vaccinations	Date des examens	Nombre animaux	Sérologie		
				Négative	Douteuse	Positive
Achetés	B 19 SC + 1 inj. de H 38 en 1972 + 3 Aborstop en 1975	Déc. 77	29	3	12	14
		Mai 78	21	0	9	12
		Déc. 78	10	1	4	5
Achetés ou nés au domaine	B 19 SC + 3 Aborstop	Déc. 77	41	18	7	16
		Mai 78	37	13	11	13
		Déc. 78	31	19	12	10
Achetés	3 Aborstop	Déc. 77	24	5	4	15
		Mai 78	24	4	9	11
		Déc. 78	20	9	3	8
Nés au domaine	B 19 SC + rappel VC	Déc. 77	20	20		1
		Mai 78	20	19		1
		Déc. 78	19	18		
Nés au domaine	B 19 en 2 VC	Déc. 77	59	59		
		Mai 78	57	56	1	
		Déc. 78	94	93	1	

C - DOMAINE DE LA MINIERE (78350 Jouy-en-Josas)

Responsable : P. GILLARD
Vétérinaire sanitaire : Dr. DESBROSSE - 78000 Versailles

I. - Composition et conduite du troupeau

Le domaine appartient à l'I.N.R.A. Il dépend du Département de Génétique Animale qui y a rassemblé des "mères à jumeaux", c'est-à-dire des vaches achetées dans des élevages où elles avaient déjà eu des jumeaux. Cet élevage était destiné à augmenter par voie génétique la probabilité d'obtenir des jumeaux.

Le troupeau est actuellement composé de 73 femelles de différentes races (Maine-Anjou, Charolaises et croisées). Il a été constitué par l'achat de 38 vaches à jumeaux en 1971-1972, de 11 en 1973 et de 5 en 1975, ajoutées aux quelque 40 vaches de race rustique (gasconne et croisées) existant auparavant à la Minière. La plupart des vaches achetées étaient gravides et accompagnées d'un certificat vétérinaire attestant qu'elles étaient indemnes de Brucellose et qu'elles provenaient d'un cheptel lui-même indemne depuis plus de quatre ans.

Les animaux sont entretenus en stabulation libre de novembre à avril. Ils consomment du foin, des pellets de luzerne et de pulpe déshydratées. Les animaux sont mis à l'herbe au printemps. En raison de la faible superficie des pâturages (7 ha), les animaux y reçoivent également du foin et des pellets. Les vaches allaitent leurs veaux durant sept mois, les femelles sont conservées pour l'élevage et mises à la reproduction pour un vêlage à trois ans.

II. - Historique de la Brucellose et des actions sanitaires et médicales entreprises

Le premier avortement brucellique a été observé en 1973 sur une vache provenant d'un troupeau reconnu lui-même brucellique, six mois après la vente de cet animal. Quatre autres vaches ont également avorté pendant cette même année.

De 1974 à 1976, les *Brucella* ont été recherchées à chaque mise-bas sur le placenta, la décharge utérine et le colostrum. Ensuite, elles ont été recherchées uniquement à l'occasion d'un avortement. Les résultats cliniques et bactériologiques sont les suivants (tableau 24) :

Tableau 24 : Résultats cliniques et bactériologiques (Domaine de La Minière)

Année	Nombre de gestantes	Avortements brucelliques	Excrétion de *Brucella*	Total (%)
1973	40	4	1	5 (12,5)
1974	28	13	1	14 (50)
1975	15	3		3 (20)
1976	30	3	2	5 (16,7)
1977	24	1		1 (4)
1978	29	1		1 (3)

Presque toutes les vaches ayant avorté et celles ayant excrété des *Brucella* ont été abattues dans le délai d'un mois après la mise-bas, d'autres ont été conservées plus longtemps dans le troupeau.

La fréquence élevée des avortements observés en 1973 et 1974 a conduit les responsables du troupeau à vacciner les vaches adultes avec du 45/20 et les génisses de 6 à 19 mois au B 19. En 1975, les génisses ont été vaccinées au B 19 à l'âge prescrit de 4 à 6 mois. Le 28 avril 1976, les génisses nées en 1974 et 1975 et déjà vaccinées au B 19 par voie sous-cutanée, ont reçu un rappel par voie conjonctivale, c'est-à-dire dans les délais compris entre 6 et 25 mois après la vaccination primaire. Depuis, les génisses reçoivent toutes deux inoculations de B 19 par voie conjonctivale dans le délai prescrit de 6 mois.

III. - Résultats

Après les abattages pour cause d'avortements brucelliques et les réformes habituelles (âge, accidents...), le troupeau, qui comprenait au début une centaine d'animaux dont les 54 mères à jumeaux, n'en comprenait plus que 73 au 3 janvier 1979. Neuf anciennes vaches sur 22 (41 %) ont une sérologie positive, contre seulement 3 sur 51 (6 %) ayant reçu le rappel par voie conjonctivale. Encore faut-il noter que deux de ces trois animaux ont reçu le rappel par voie conjonctivale avec beaucoup de retard (22 mois), délai pendant lequel leur protection n'était assurée que par une injection sous-cutanée de B 19. Parmi les 35 génisses nées en 1976 et après, et ayant reçu deux inoculations par voie conjonctivale à 6 mois d'intervalle, une seule présente une sérologie momentanément douteuse. La contamination est cependant restée élevée, puisque 7 avortements ont été observés de 1976 à 1978 et que l'élimination des avorteuses a été tardive et incomplète.

D - DOMAINE DE LA VERRERIE (81400 Carmaux)

Responsable : G.P. FABRE
Vétérinaire sanitaire : Dr. ALARY - Carmaux

I. - Composition et conduite du troupeau

Le domaine appartient à l'I.N.R.A. Il dépend du Département de Génétique Animale qui y poursuit des expériences de génétique et de zootechnie.

Le troupeau est composé d'environ 200 vaches de différentes races (Charolaise, Blonde d'Aquitaine, Limousine et croisées). Il a été constitué par l'achat d'animaux tous contrôlés à l'arrivée au Domaine par sérologie.

Les animaux sont en stabulation libre l'hiver. En été, le pâturage se fait par lots : génisses, femelles gravides, femelles en synchronisation.

En hiver, ils consomment de l'ensilage de maïs, du foin, de la farine d'orge et des condiments minéraux. En été, les animaux, au pâturage, ne reçoivent pas de complémentation.

II. - Historique de la Brucellose et actions entreprises

La maladie est apparue en 1973. Les animaux avaient alors tous été vaccinés au 45/20. Les examens sérologiques donnant alors, en fonction de différents lots de vaccin, des résultats difficiles à interpréter, il fut décidé dès 1973 de rechercher les *Brucella* sur chacun des placentas et d'abattre les animaux reconnus infectés.

Les génisses nées en 1974 reçoivent du B 19 par voie sous-cutanée et un rappel de 45/20. Les génisses nées au printemps 1975 reçoivent une injection sous-cutanée de B 19 (fin 1975) et un rappel de B 19 par voie conjonctivale (13 avril 1976). Ensuite, toutes les jeunes femelles reçoivent du B 19 en deux inoculations conjonctivales à six mois d'intervalle.

III. - Résultats

Trois vaches ont été reconnues infectées par l'examen du placenta en 1973, neuf en 1974, cinq en 1975, deux en 1976 et aucune depuis. Toutes ces vaches ont été immédiatement éliminées.

1. Examens sérologiques (tableau 25)

Examen du 13/09/1976 : Sérologie positive : 65/202 (32 %), dont 46/105 (44 %) ayant reçu du 45/20 ; 17/41 (41 %) ayant reçu du B 19 en sous-cutanée avec un rappel au 45/20 ; et 2/56 (3,6 %) ayant reçu du B 19 par voie conjonctivale.

Examen du 25/01/1977 : Sérologie positive : 9/147 (toutes ayant été reconnues infectées lors du dépistage précédent et n'ayant pas encore été éliminées). Aucun animal n'a été reconnu infecté lors des dépistages ultérieurs (28/09/1977, 01/03/1978 et 12/10/1978).

Tableau 25 : Résultats des examens sérologiques du 13/09/1976 : Troupeau de La Verrerie, Carmaux (D.S.V. du Tarn)

Date de naissance	Vaccination	Sérologies positives/total (%)	
1967	2 Abortox	7/11	
1968	2 Abortox	4/13	
1970	2 Abortox	5/7	
1971	2 Abortox	20/47	46/105 (44 %)
1972	2 Abortox	2/9	
1973	2 Abortox	8/18	
1974	B 19 SC + 1 Abortox	17/41	(41 %)
1975	Printemps B 19 SC + VC Automne B 19 en 2 VC	0/24 2/32	2/56 (3,6 %)

IV. - Discussion

Les génisses nées en 1974 et 1975 ont été en contact avec des vaches infectées, dont certaines ont avorté ou été reconnues excrétrices de *Brucella* (9 en 1974, 5 en 1975, 2 en 1976), jusqu'au début de 1977 lorsque s'est achevée leur élimination. Si les conditions de contamination ne sont pas très exactement les mêmes pour les génisses des deux générations, elles sont cependant très voisines et la différence ne suffit pas à expliquer l'écart très important observé entre les taux d'infection. Il faut noter, que dans des conditions de contamination sans doute bien plus différentes, entre 1967 et 1974, les taux d'infection constatés chez les animaux ayant reçu des vaccinations dont l'efficacité est très proche (45/20 en deux injections, ou 45/20 en rappel sur une injection sous-cutanée de B 19) ne sont pas différents (44 % et 41 %).

E - DOMAINE DU JOLY (88500 Mirecourt)

Chef du Service Elevage : P. Faire
Vétérinaire sanitaire : Dr. F. JEAUDEL, Mirecourt

I. - Composition et conduite du troupeau

Le troupeau appartient à l'I.N.R.A. et dépend du Département de Génétique Animale. Il est destiné à des recherches sur l'amélioration génétique de la race Montbéliarde.

Il comprend environ 130 femelles de race Montbéliarde. Génisses et vaches primipares sont en stabulation libre, les vaches multipares sont pour moitié en stabulation libre et en stabulation entravée. Tous les animaux vont au parc en été.

Les animaux consomment de l'ensilage (maïs, herbe), du foin de légumineuses et des concentrés : aliment vache 18, du tourteau de soja et un condiment minéral.

II. - Historique de la Brucellose et actions entreprises

La Brucellose sévit depuis longtemps dans ce Domaine, en dépit de la vaccination régulière des génisses avec le B 19 par voie sous-cutanée. De 1970 à 1975, 57 vaches ont été éliminées pour tenter d'enrayer la maladie. En 1975-1976, une flambée d'avortements survient : 27 vaches avortent et 52 ont une sérologie positive sur 119 examinées (44 %).

Le 3 mars 1976, il est décidé :

1) d'injecter de la terramycine aux 52 vaches à sérologie positive ;
2) d'injecter du H 38 aux 67 vaches à sérologie négative ;
3) de faire un rappel au B 19 par voie conjonctivale à toutes les génisses non gravides ou gestantes de moins de 5 mois et ayant déjà reçu du B 19 par voie sous-cutanée ;

4) de prévoir la vaccination au B 19 de toutes les génisses par une injection sous-cutanée, suivie de deux rappels par voie conjonctivale à 6 mois d'intervalle ;

5) d'éviter momentanément tout abattage pour cause de Brucellose.

Le placenta des vaches ayant avorté est examiné au laboratoire de la D.S.V. des Vosges.

Le 28 septembre 1978, on décide d'éliminer tous les animaux présentant une sérologie positive, le nombre élevé de jeunes vaches et de génisses reconnues non infectées par la sérologie devant assurer une reconstitution rapide du troupeau.

III. - Résultats

Après la flambée de 1975-1976, seulement quatre avortements d'origine brucellique sont observés en 1976-1977. Cinq avortements ont eu lieu ensuite, aucun n'était d'origine brucellique (*Salmonella Dublin* fut isolée).

L'inoculation de B 19 par voie conjonctivale sur les génisses gestantes de 5 mois n'a pas entraîné d'avortement.

Un examen sérologique fait en avril 1978 indique que :

- 40 vaches sur les 44 ayant reçu du H 38 (91 %) et 17 sur les 22 ayant reçu de la terramycine (77 %), soit au total 57 sur 66 (86,4 %) ont une sérologie positive ;
- parmi les 76 vaches et génisses ayant reçu du B 19 par voie sous-cutanée et un rappel par voie conjonctivale, 5 ont une sérologie positive (6,5 %).

L'examen pratiqué par la D.S.V. le 7 décembre 1978 montre que sur 138 animaux, 28 ont une sérologie positive dont :

- 24 sur les 43 (55,2 %) ayant reçu deux ans et demi auparavant de la terramycine ou du H 38 (23 vaches ayant reçu ces traitements et examinées en avril 1978 ont été réformées entre-temps) ;
- 4 sur les 95 (4,2 %) ayant reçu du B 19 en sous-cutanée et un rappel par voie conjonctivale.

Depuis le début des vaccinations au B 19 et rappels par voie conjonctivale, 14 vaches et génisses sur 128 (10,9 %) ainsi vaccinées ont présenté une sérologie positive. Parmi ces 14 animaux à sérologie positive (dont les 5 déjà

dépistés en avril 1978), deux seulement ont reçu le rappel par voie conjonctivale dans le délai prescrit de six mois. Les 12 autres ont reçu ce rappel en 1976 dans des délais compris entre 10 mois et deux ans après la primo-vaccination par voie sous-cutanée.

IV. - Discussion

L'examen sérologique du 7 décembre 1978 fait apparaître globalement que 55,8 % des anciennes vaches ont une sérologie positive, contre 10,9 % des animaux vaccinés avec rappels par voie conjonctivale.

Il faut alors noter que :

— parmi les 55,8 % d'animaux à sérologie positive, 32 ont reçu du H 38 dont 19 ont une sérologie positive, sans que l'on puisse savoir s'il s'agit d'anticorps infectieux ou vaccinaux et 11 ont reçu de la terramycine, dont 5 ont une sérologie positive ;

— 50 génisses nées en 1973 et 1974 ont été en contact avec les 27 vaches avortées en 1975-1976, avec comme seule protection celle donnée par une injection sous-cutanée de B 19 (le rappel a été fait beaucoup plus tard, en mars 1976) : 11 ont une sérologie positive (22 %) ;

— 45 génisses nées en 1975 ont été vaccinées par voie sous-cutanée et ont reçu le premier rappel dans le délai prescrit de six mois : deux seulement (4 %) ont une sérologie positive. Elles ont été soumises à des conditions de contamination, sinon identiques, mais au moins très comparables puisqu'elles ont vécu pendant près de 3 ans au contact de nombreuses vaches infectées (dont l'abattage définitif n'a été réalisé qu'en début 1979) et dont quatre ont avorté en 1976-1977.

F - DOMAINE DU BOIS VERNOIS (39120 Voiteur)

Appartenant à la Société Coopérative Jura Bétail
Gestionnaire : E. RICHEME
Vétérinaire sanitaire : Dr. J.B. BUFFET - Le Louverot 39120 Voiteur

Le troupeau comprend environ 300 têtes en moyenne. Il est destiné à vulgariser des expériences zootechniques (sélection, index de vitesse de traite), d'alimentation, et à commercialiser des animaux sélectionnés.

I. - Historique de la Brucellose et actions entreprises

Elle fut dépistée pour la première fois par sérologie en 1973, mais elle devait sévir dans le troupeau depuis plus longtemps. Depuis le 1er janvier 1973, 221 animaux ont été abattus pour cause de Brucellose. Aucune vaccination n'a été faite depuis 1973.

Il est décidé alors le 24 novembre 1977 d'effectuer la vaccination au B 19 par voie conjonctivale en deux inoculations à six mois d'intervalle sur toutes les femelles âgées de plus de 6 mois et à sérologie négative, par voie sous-cutanée avec un rappel par voie conjonctivale six mois plus tard sur toutes les génisses âgées de 3 à 6 mois. Tous les animaux à sérologie positive sont abattus. Un contrôle sérologique sera effectué trois fois par an, dont une fois dans la période *post partum*.

Le 20 décembre 1977, le troupeau comprenait :

- 156 vaches laitières, dont 68 à sérologie positive (44 %),
- 72 génisses de 1 à 2 ans, non gravides, dont 10 à sérologie positive (14 %),
- 50 génisses de moins d'un an.

Après l'autorisation de la Direction de la Qualité (16 janvier 1978) et de la D.S.V. du Jura (27 janvier 1978), la première vaccination a été effectuée le 8 mars 1978.

II. - Résultats

Au 8 mars 1978, toutes les femelles vaccinées étaient négatives en SAW, sauf une (30 UI/ml) ; 15 présentaient des réactions faibles en fixation du complément : leur sérologie a été considérée comme momentanément négative.

L'examen sérologique du 13 septembre 1978 n'a pas dépisté d'animaux infectés. Les réactions positives à la fixation du complément, observées précédemment sur 15 animaux, ont été retrouvées sur 4 et ont disparu sur 11. Deux autres animaux présentent une réaction faible en fixation du complément.

Un avortement s'est produit en novembre 1978 : aucune *Brucella* n'a été mise en évidence par coloration et par culture.

L'examen sérologique de février 1979 a dépisté trois animaux infectés sur 182 (1,5 %).

Remarque générale concernant ces expérimentations sur le terrain
Résumé sérologique - Protocole vaccinal

Il n'a pas été constitué de groupes témoins de génisses non vaccinées pour deux raisons :

— Le but de ces interventions était l'assainissement de troupeaux de haute valeur génétique et expérimentale. Il n'était donc pas question de laisser une partie des génisses sans protection contre une contamination élevée et durable.

— Un groupe de génisses non vaccinées ne constitue pas proprement dit un groupe témoin : la diminution du taux d'infection parmi les vaccinées amène une diminution du taux d'infection parmi les témoins, ce qui fausse la comparaison. Pour réaliser des groupes témoins réels, il aurait fallu trouver six troupeaux de taille, de taux d'infection et de situation comparables aux six troupeaux étudiés et dans lesquels aucune prophylaxie n'aurait été mise en oeuvre, ce qui est évidemment impossible.

On ne peut alors juger de la valeur intrinsèque de la vaccination par voie conjonctivale. Cependant, l'expérience que l'on a de la contagiosité de

la Brucellose permet d'imaginer facilement le devenir des génisses non protégées dans des troupeaux hautement infectés où l'on observe régulièrement des avortements, comme c'est le cas à Carmaux, Jouy, Laqueuille et Mirecourt. Dans ces quatre troupeaux, on constate que les résultats vont tous dans le même sens : parmi les génisses ayant reçu le rappel par voie conjonctivale dans le délai prescrit de six mois après la primovaccination, peu sont reconnues infectées par la sérologie, en dépit d'une contamination élevée et permanente. Au contraire, la proportion de génisses nées en 1974 et début 1975 et ayant reçu tardivement le rappel par voie conjonctivale (de 12 à 25 mois après la primovaccination), est encore relativement élevée, bien que très inférieure à la proportion des animaux non vaccinés ou vaccinés différemment. Enfin, le nombre des génisses vaccinées avec rappel par voie conjonctivale et reconnues infectées n'augmente pas (Carmaux), ou n'augmente que très peu d'un examen sérologique au suivant (Laqueuille, Mirecourt).

Cette discussion démontre la supériorité d'une vaccination (B 19 avec rappel conjonctival) qui, non seulement protège très nettement mieux que les autres méthodes évoquées ici (B 19 en une seule injection sous-cutanée à Jouy et Mirecourt ou suivie d'un rappel d'Abortox à Carmaux ou d'Aborstop à Laqueuille, avec la vaccination à l'Abortox seul à Carmaux ou Aborstop seul à Laqueuille), mais qui de plus évite toute ambiguïté d'interprétation des interférences vaccinales si contestables. De plus, la prophylaxie sanitaire peut être mise en oeuvre trois mois après chacune des inoculations par voie conjonctivale.

Enfin, lorsque l'on regroupe les résultats de la vaccination au B 19 avec rappel conjonctival dans les quatre troupeaux, on observe que (tableau 26) :

— La proportion des génisses ainsi vaccinées (et dont certaines ont déjà vêlé une ou plusieurs fois) et à sérologie positive est très basse (5,4 %) en dépit d'une contamination durable et élevée. Encore faut-il distinguer celles nées en 1974, qui ont reçu le rappel trop tardivement et dont 13/56 (23,2 %) ont une sérologie positive, de celles nées en 1975 et depuis, dont

Tableau 26 : Tableau récapitulatif : Proportion de génisses à sérologie positive, en fonction de leur année de naissance, dans les quatre troupeaux où la vaccination avec B 19 en rappel a été pratiquée depuis le printemps 1976 (examens sérologiques de fin 1978 et début 1979)

Av. = nombre d'avortements observés ; P.F. = pas fait
Toutes ces génisses sont celles qui restent dans les troupeaux après des réformes habituelles (stérilité, accidents...). Aucune réforme pour cause de Brucellose n'est intervenue, sauf pour une génisse ayant avorté(Laqueuille) et sauf pour 2 génisses de Mirecourt reconnues brucelliques et abattues au cours de l'année 1978. Ces génisses réformées sont comptabilisées dans ce tableau comme ayant une sérologie positive en fin 1978.

Année de naissance	Carmaux		Jouy		Laqueuille		Mirecourt		Total	
	Pos./total	Av.	Pos./total	Av.	Pos./total	Av.	Pos./toal	Av.	Pos./total (%)	Av.
1974	0	9	2/8	14	0/3	1	11/45	?	13/56 (23,2)	24
1975	2/56	5	1/8	3	1/22	17	2/45	27	6/131 (4,6)	52
1976	0/25	2	1/10	5	0/47	9	1/33	4	2/115 (1,7)	20
1977	0/26	0	0/10	1	0/24	4	P.F.	0	0/60	5
1978	0/13	0	0/15	1	P.F.	1	P.F.	0	0/28	2
Total	2/120		4/51		1/96		14/123		21/390 (5,4)	

seulement 8/334 (2,4 %) sont reconnues infectées par la sérologie. Ces taux sont à comparer à ceux observés chez les anciennes vaches (de 41 à 56 % selon les troupeaux), quelles qu'aient été les vaccinations utilisées.

— Une protection réellement efficace n'est obtenue que lorsque les animaux reçoivent le rappel conjonctival dans le délai prescrit de six mois après la vaccination primaire, par voie sous-cutanée ou par voie conjonctivale.

Le protocole de vaccination peut alors être le suivant : vaccination par voie conjonctivale :

— Six mois après une vaccination standard par voie sous-cutanée pour renforcer l'immunité créée par la vaccination primaire. Ce mode a été appliqué dans les troupeaux de Bois Vernois et de Mirecourt et sur la moitié des génisses de Marcenat. Il l'a également été au printemps 1976 sur les génisses nées en 1974 et 1975 dans les troupeaux de Carmaux, Jouy et Laqueuille, après une primovaccination en 1974 et 1975 par voie sous-cutanée.

— En deux inoculations par voie conjonctivale à six mois d'intervalle ; c'est le mode définitivement utilisé dans les troupeaux de Carmaux, Jouy, Laqueuille et Marcenat, sur l'autre moitié des génisses.

Les travaux réalisés à l'I.N.R.A. de Tours ont donc permis de mettre au point une vaccination antibrucellique originale dont l'efficacité a été démontrée sur le terrain dans des élevages particulièrement contaminés. Il restait donc à montrer, dans une troisième partie, l'innocuité de cette méthode et à définir sa mise en oeuvre en vue d'une utilisation pratique et généralisée.

Troisième Partie

INNOCUITE ET MISE EN OEUVRE DE LA METHODE

A - INNOCUITE DE LA METHODE - ETUDE TOXICOLOGIQUE

Nous rapporterons dans ce chapitre les travaux effectués à la Station de l'I.N.R.A. de Tours par Monsieur JOUBERT pour obtenir le dossier d'A.M.M. Cette étude permettra donc de mettre en évidence les risques pathologiques pouvant survenir à la suite de la vaccination par voie conjonctivale.

I. - Tolérance locale

Un seul cas de conjonctivite a été observé après la vaccination d'environ 1.800 génisses (1.400 dans les six troupeaux, 400 à la Station). L'affection a duré deux jours et a guéri sans traitement. Aucun germe pathogène n'a été isolé.

II. - Diffusibilité

Des écouvillons (FALCON ND - Mérieux) ont été passés sur le globe oculaire et dans la bouche de 41 vaches vaccinées par voie conjonctivale, une fois par jour pendant quatre jours consécutifs à partir du lendemain de la

vaccination. Ces prélèvements ont été ensemencés sur milieu WE. Aucune *Brucella* n'a été isolée.

Du lait a été prélevé sur 33 vaches vaccinées par voie conjonctivale en cours de lactation, une fois par semaine pendant six semaines consécutives, puis une fois toutes les deux semaines, trois fois consécutives. En outre, du lait de 7 vaches et 7 génisses vaccinées à des stades de gestation compris entre 7 et 9 mois, a été prélevé le jour du vêlage. Après centrifugation, crème et culot ont été ensemencés séparément sur milieu WE. Aucune *Brucella* n'a été isolée.

Toutes les femelles vaccinées en fin de gestation ont vêlé à terme. Deux veaux sont morts : l'un de dystocie, l'autre à 48 heures. Aucune *Brucella* n'a été isolée de la rate, des poumons et du liquide gastrique prélevés sur ces deux veaux. Ceci confirme l'absence de nocivité foetale déjà notée sur des génisses gestantes de 5 mois au plus (Mirecourt) et quel que soit le stade de gestation (Bois Vernois). Au moment du vêlage, la souche 19 a été recherchée dans la décharge utérine par écouvillonnage et ensemencement sur milieu WE. Une souche de *Brucella abortus* ayant les caractères de la souche 19 (biotype 1, indépendance vis-à-vis du CO_2, ne croissant pas en présence d'érythritol ou de 5 UI de pénicilline par ml de gélose trypticase-soy) a été isolée de la décharge utérine d'une vache ayant vêlé à terme (280 j.) d'un veau vivant et vigoureux.

Treize génisses, âgées de 3,5 à 5,5 mois, nées dans un troupeau indemne de Brucellose, ne présentant pas d'anticorps antibrucelliques, ont été élevées en liberté dans un box de dimensions restreintes (environ 2,5 x 8 m). Quatre ont reçu 5×10^9 *Brucella abortus* souche 19 (une dose) et quatre en ont reçu 25×10^9 (cinq doses) deux fois à un mois d'intervalle. Les cinq autres génisses, non vaccinées, ont été utilisées comme témoins. La sérologie a été faite toutes les semaines pendant deux mois. Toutes les génisses vaccinées montrent une réaction sérologique, certaines très discrète, d'autres plus régulière (tableau 27). Dans les conditions de cette expérience et sur un nombre restreint d'animaux, l'intensité des réactions ne paraît pas être en rapport avec la dose de vaccin administrée. Les témoins ne présentent pas d'anticorps, bien qu'ayant été en contact très étroit avec les génisses vaccinées.

En conclusion, on n'a pas pu mettre en évidence de diffusibilité du B 19 par les larmes et la salive. En revanche, le danger d'une excrétion de la souche B 19 existe chez les vaches vaccinées au cours de la gestation, soit par la décharge utérine, soit par le lait.

III. - Toxicité secondaire

1. Recherche des anticorps

La réponse sérologique après deux inoculations par voie conjonctivale à six mois d'intervalle avec 5 x 10^9 B 19 a déjà été décrite (cf. Première Partie, Chapitre C).

La réponse sérologique après deux inoculations par voie conjonctivale avec soit 5 x 10^9 B 19 ou 25 x 10^9 B 19 à un mois d'intervalle a été donnée (tableau 27).

Dans les deux cas, les réponses sont de faible amplitude (inférieures à 30 UI/ml en moyenne) et de faible durée (inférieure à 3 mois), aussi bien après la vaccination primaire qu'après le rappel. Sur un nombre réduit d'animaux (8), la réponse ne semble pas différente, que la dose de B 19 inoculée soit la dose recommandée (5 x 10^9) ou cinq fois cette dose.

La réponse sérologique sur les 47 vaches et génisses ayant reçu 5 x 10^9 B 19 au cours de la gestation ou après n'a pu être analysée, beaucoup d'entre elles ayant déjà reçu d'autres antigènes (H 38, fractions de *Brucella*) en rappels, ce qui modifiait notablement la réponse de quelques vaches.

En revanche, l'évolution du Ring-test chez des vaches adultes recevant la vaccination par voie conjonctivale au cours de la lactation a été étudiée. L'épreuve a été faite sur le lait individuel de 20 vaches vaccinées le 21 juin 1978 et de 33 vaccinées le 5 février 1979 (1 ml de lait, une goutte d'antigène Mérieux n° 7 FG 006, lecture après incubation de une heure au bain-marie à 37°C) (tableau 28). Les réactions où l'anneau de crème était parfaitement blanc et la colonne de lait franchement colorée ont été considérées comme négatives et comme positives d'intensité une croix les réactions où l'anneau est

Tableau 27 : Résultats sérologiques suivant la dose employée - Sérologie après vaccination par voie conjonctivale (I.N.R.A. - Nouzilly)

Quatre génisses ont reçu la dose 5 (25×10^9 B 19), 4 la dose 1 (5×10^9) et 5 la dose 0 (témoin).
Dates des vaccinations : 05/02/79 et 06/03/79.
SAW et FC : inverse des dilutions ; l'intensité des réactions est exprimée en nombre de croix.
SAW : 1/10 (2, 3, 4) = 15 UI/ml - 1/20 (2, 3, 4) = 30 UI/ml - 1/40 (2, 3) = 60 UI/ml - 1/40 (4) = 80 UI/ml - 1/80 = 120 UI/ml
L'intensité des réactions sérologiques ne semble pas être en rapport avec la dose de vaccin administrée. Les témoins ne présentent pas d'anticorps, bien qu'ayant été en contact très étroit avec les vaccinées

N°		*		21/02/79						27/02/79					06/03/79**					13/03/79				
		SAW	FC	SAW				FC		SAW				FC	SAW			FC		SAW			FC	
				10	20	40	80	5	10	10	20	40	80	5	10	20	40	5	10	10	20	40	5	10
53	5	-	-	3	2	-		-		3	2	-		-	2	-				2	-		-	
54	1	-	-	1				-		1				-	-					-			-	
55	1	-	-	3	3	2	-	-		4	3	2	-	-	4	4	-	1	-	4	4	-	-	
58	0	-	-	-				-		-				-	-					-			-	
59	5	-	-	2				-		-				-	-					-			-	
61	0	-	-	-				-		-				-	-					-			-	
62	1	-	-	-				-		-				-	-					2	-		4	-
63	1	-	-	-				-		-				-	2					-			-	
64	0	-	-	-				-		-				-	-					-			-	
67	5	-	-	2	2	-		-		-				-	-					-			-	
68	0	-	-	-				-		-				-	-					-			-	
69	5	-	-	-				-		-				-	-					-			-	
70	0	-	-	-				-		-				-	-					-			-	

* Vaccination primaire (05/02/79) - ** Rappel

(suite tableau 27)

N°		*		20/03/79					26/03/79						03/04/79						10/04/79					
		SAW	FC	SAW			FC		SAW			FC			SAW			FC			SAW			FC		
				10	20	40	5	10	10	20	40	5	10	20	10	20	40	5	10	20	10	20	40	5	10	20
53	5	–	–	1	–		4	–	2	1	–	4	–		2	1	–	2	–		–			–		
54	1	–	–	–			2	–	–			–			–			–			–	–		–		
55	1	–	–	2	–		4	–	3	2	–	4	–		4	2	–	2	–		3	2	–	2	–	
58	0	–	–	–			–		–			–			–			–			–			–		
59	5	–	–	–			4	–	2	–		4	–		2	–		2	–		2			1	–	
61	0	–	–	–			–		–			–			–			–			–			–		
62	1	–	–	2	–		4	–	2	–		4	2		1	–		4	1	–	2	–		2	–	
63	1	–	–	–			–		–			–			–			–			–			–		
64	0	–	–	–			–		–			–			–			–			–			–		
67	5	–	–	–			4	–	–			4	–		–			–			–			–		
68	0	–	–	–			–		–			–			–			–			–			–		
69	5	–	–	–			–		–			2	–		–			–			–			–		
70	0	–	–	–			–		–			–			–			–			–			–		

* Vaccination primaire (05/02/79)

très faiblement coloré à la base, la colonne de lait étant toujours franchement colorée. Nous avons également les résultats du ring-test fait sur ces mêmes vaches, par le Laboratoire Interprofessionnel Laitier du Loir-et-Cher (7, rue Porte-Clos-Haut - 41000 Blois).

On observe des réactions positives dès la semaine suivant la vaccination, environ 1/4 des animaux présente une réaction positive à la troisième semaine, puis cette proportion diminue progressivement. Toutes les réactions sont d'intensité une croix, sauf chez une vache ayant reçu du H 38 et chez une autre ayant reçu des fractions vaccinales de *Brucella*. Le ring-test d'étable est positif entre les 3e et 5e semaines ; il redevient négatif ensuite.

En cas de vaccination d'urgence de vaches en cours de lactation, l'éleveur devra donc être prévenu de l'éventualité de réactions positives au ring-test d'étable pour une durée d'environ deux mois après la vaccination.

2. Réactions allergiques

L'état de sensibilisation a été recherché au cours d'une expérience déjà décrite (cf. Première Partie, p. 31 § b), par l'injection intradermique de 0,1 ml d'une solution de 100 µg de brucelline en eau physiologique tamponnée. Dans cette expérience, 79 génisses avaient reçu deux inoculations de B 19 par voie conjonctivale (VC + VC), et 40 avaient reçu le B 19 d'abord par voie sous-cutanée, puis en rappel par voie conjonctivale (VSC + VC) à six mois d'intervalle. Les résultats (tableau 29) indiquent que, parmi les génisses vaccinées uniquement par voie conjonctivale, moins de 14 % des animaux sont sensibilisés et que cette sensibilisation disparaît en moins de 15 mois, durée de l'observation. Les animaux vaccinés selon le mode VSC + VC sont plus nombreux à présenter une réaction allergique et un quart environ d'entre eux réagissent encore au bout de 15 mois. Toutes les réactions sont faibles.

Dans une autre expérience, 8 génisses âgées de 3,5 à 5,5 mois ont été vaccinées par voie conjonctivale deux fois à un mois d'intervalle : 4 ont reçu une dose normale (5×10^9 *Brucella abortus* souche 19) et 4 cinq fois la dose normale. Elles ont reçu en trois fois successives 100 µg de brucelline, le jour de la première vaccination, le jour du rappel et un mois après, en même

Tableau 28 : Evolution du Ring-test chez des vaches adultes recevant la vaccination par voie conjonctivale en cours de lactation

	J0	+ 1	+ 2	+ 3	+ 4	+ 5	+ 6	+ 7	+ 8	+ 9*
20 vaches 21/06/78										
RTI(a)	0/20	0/20	4/20	5/20	1/20	1/20	1/20	0/19	0/19	2/18
RTE(b)	0			++						0
33 vaches (05/02/79										
RTI	0/33	5/33	PF(c)	9/33	6/33	8/33	PF	7/31	PF	7/31
RTE	0				+	++		0		
Total	0/53	5/53	4/20	14/53	7/53	9/53	1/20	7/50	0/19	9/49

* Semaines
(a) Ring-test individuel
(b) Ring-test d'étable
(c) PF = pas fait

temps que cinq autres génisses non vaccinées et élevées avec elles dans un même box. Aucune réaction n'a été observée le jour de la vaccination. Le jour du rappel, cinq présentaient une réaction (dont trois ayant reçu la dose normale de vaccin et deux la dose cinq fois plus forte). Un mois après le rappel, aucune réaction n'a été observée.

La souche B 19 provoque donc une sensibilisation qui ne se traduit que par des réactions peu intenses qui disparaissent dans un délai assez bref.

Tableau 29 : Réactions allergiques après vaccination au B 19 et rappel par voie conjonctivale après une vaccination primaire soit par voie conjonctivale (VC + VC), soit par voie sous-cutanée (VSC + VC)

Date des épreuves (délai après vaccination)	Réactions positives/total		
1ère vaccination 11/08/76	Témoins	VC + VC	VSC + VC
21/09/76 (40 jours)	1/11	11/79	32/40
03/12/76 (4 mois)	0/11	2/79	15/40
Rappel le 22/02/77	Témoins	VC + VC	VSC + VC
22/03/77 (1 mois)	0/11	11/79	24/40
21/11/77 (9 mois)	0/11	0/40*	9/40

* 39 génisses ont été éliminées pour infécondité ou fécondation tardive

3. Réactions locales et générales

L'absence de réaction locale a déjà été indiquée (cf. p. 81, § I). Aucune réaction générale n'a été observée, tant sur les génisses que sur les vaches en lactation. L'appétit n'a pas été affecté par la vaccination. La température et la production lactée n'ont pas été modifiées (tableau 30).

Tableau 30 : Modification de la température et de la production lactée après vaccination conjonctivale avec 5 x 10^9 *Brucella abortus* 19, le 5 février 1979 (moyenne des mesures sur 41 vaches)

Contrôle laitier (sur 2 jours)		Température (prise une fois par jour, le matin)	
31 janvier 1er février	19,55 l	5 février	38,57 ± 0,05 °C
2 et 3 février	19,97 l	6 février	38,51 ± 0,05 °C
4 et 5 février	19,50 l	7 février	38,51 ± 0,04 °C
6 et 7 février	20,26 l	8 février	38,55 ± 0,04 °C
8 et 9 février	20,00 l	9 février	38,48 ± 0,03 °C
10 et 11 février	19,97 l		
12 et 13 février	20,47 l		

IV. - Nocivité foetale

Des génisses et des vaches gravides ont été vaccinées par voie conjonctivale (jusqu'à 5 mois de gestation à Mirecourt, quel que soit le stade de gestation à Bois Vernois et à Nouzilly). Une seule a avorté (Bois Vernois) : aucune *Brucella* n'a été retrouvée. Toutes les autres vaches ont vêlé à terme.

Cependant, une vache a excrété des *Brucella abortus* souche 19 au moment de la mise-bas. Tout danger d'avortement dû à la souche B 19 ne peut donc pas être écarté chez les vaches vaccinées par voie conjonctivale en fin de gestation. En revanche, l'excrétion de B 19 chez les vaches vaccinées à l'âge de 6 à 12 mois n'a jamais été observée au cours des expériences réalisées à la Station de l'I.N.R.A.

Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la vaccination du bétail par voie conjonctivale avec le vaccin B 19 comporte très peu d'inconvénients. Elle se révèle donc être un mode de vaccination original, intéressant,

tant par sa sécurité d'emploi que par la facilité de sa mise en oeuvre, que nous allons développer dans le chapitre suivant.

B - MISE EN OEUVRE DE LA METHODE

I. - Définition et caractéristiques générales du vaccin

1. Produit

Le B 19 conjonctival est un vaccin à *Brucella abortus* Buck 19, vivante, cultivée sur milieu liquide, ajustée à un titre donné, lyophilisée et administrée par instillation conjonctivale chez les bovins.

La forme pharmaceutique est présentée par des flacons de 10 doses, avec un flacon de solvant et un compte-gouttes spécial.

La dénomination du vaccin est la suivante : "B 19 Conjonctival", licence I.N.R.A., Vaccin vivant, souche B 19, par voie conjonctivale, contre la Brucellose bovine.

Les compositions du vaccin et du diluant sont les suivantes :

— Vaccin. - Chaque flacon de 10 doses contient :

- *Brucella abortus* souche Buck 19.. 50 x 10^9 UFC*
- Thiourée..... 25 mg
- Lactose..... 50 mg
- Acide ascorbique..... 5 mg

* UFC : unités formant colonies, soit pour 0,1 ml ou 2 gouttes = 5 x 10^9 UFC

— Diluant. - Pour 1 ml de composition :

- Bleu de protamine..... 0,05 mg (colorant)
- Eau distillée q.s.p. ..... 1 ml (pH = 7,5 $\pm$ 0,5)

2. Nature et composition du récipient

Le flacon est en verre étiré de type II avec traitement de surface. Le bouchon est en butyl à vulcanisation conventionnelle, conforme aux normes DIN 58366 et DIN 58367.

3. Mode et voie d'administration - Posologie

On dissout la pastille lyophilisée à l'aide du solvant coloré : 1 ml par flacon de 10 doses avec le dispositif spécial. La dose est de 0,1 ml par animal à déposer sur le globe oculaire ou dans le sac conjonctival de l'animal, ce qui correspond à 2 gouttes au compte-gouttes spécial.

De cette façon, l'opérateur ne sera jamais en contact avec le vaccin et sera donc à l'abri de toute contamination.

4. Durée de conservation

Le vaccin se conserve 1 an au réfrigérateur entre + 2°C et 8°C et à l'obscurité. Il ne doit pas être congelé.

5. Fabrication

Ce vaccin est fabriqué par l'Institut Mérieux de Lyon et conditionné à Lentilly par le même Institut.

II. - Indications

1. Indications générales

a) Vaccination des génisses

Il existe deux procédés :

• Vaccination classique au B 19 dans la fourchette de 4-6 mois, suivie d'un rappel conjonctival 6 à 12 mois plus tard. Ce procédé confère une excellente immunité ; il est recommandé dans les milieux ou zones hautement infectés. Cependant, il garde les inconvénients de la vaccination classique :

fourchette étroite, réactions sérologiques post-vaccinales mettant les génisses hors commerce 6 à 12 mois et persistant sur 2 % des animaux.

• Vaccination conjonctivale seule : première vaccination entre 4 et 10 mois, la seconde 6 à 12 mois plus tard, entre 10 et 16 mois. Cela assure une bonne immunité et limite les interventions du vétérinaire à deux par an. On évite aussi les réactions sérologiques post-vaccinales.

b) Vaccination des adultes

Deux vaccinations à 6 mois d'intervalle (ce délai peut être ramené à 4 en cas d'urgence). Une seule vaccination suffit, si les vaches ont été vaccinées au B 19 étant génisses ; ainsi,

- on renforce la protection d'un troupeau indemne ;
- on maîtrise la propagation de l'infection dans un troupeau infecté sans interrompre la prophylaxie sanitaire par abattage.

La vaccination des adultes peut être faite à tout moment, y compris pendant la gestation. Cependant, sauf urgence, il faudra éviter la vaccination après le 5e mois de gestation. Le vaccin peut atteindre le placenta et la mamelle sur 2 à 3 % des animaux, sans provoquer d'avortement, être excrété au moment du part et dans le lait. Sur des vaches en lactation, la vaccination peut rendre le Ring-test individuel positif sur 1 à 2 % des vaches pour quelques mois, ainsi que le Ring-test d'étable.

2. Indications du vaccin conjonctival en fonction de l'état d'avancement de la prophylaxie collective

a) Zones indemnes de Brucellose

— Vaccination des génisses destinées à être exportées hors de la zone.

— Vaccination de précaution des troupeaux soumis à un risque quelconque (zone frontière, proximité des marchés...).

b) Zones en prophylaxie

— Vaccination des génisses en place ou en plus de la vaccination classique.

— Vaccination des adultes en cas de risque de voisinage.

— Vaccination des génisses et adultes à sérologie négative dans les troupeaux infectés.

Cette dernière indication est particulièrement intéressante ; la propagation de la maladie est presque entièrement arrêtée, ce qui permet de sauver une forte proportion des animaux à sérologie négative au moment de la première intervention. Les infectés inapparents (à sérologie négative), qui se positivent peu à peu, ne risquent pas de contaminer l'effectif.

Après vaccination conjonctivale, quelques réactions sérologiques postvaccinales peuvent gêner le diagnostic pendant au maximum trois mois. On doit donc opérer comme suit :

- sérodiagnostic et élimination des positifs ; primovaccination ;
- à 3 mois, sérodiagnostic et élimination des positifs ;
- à 6 mois, sérodiagnostic et élimination des positifs ; primovaccination ;
- à 9 mois, sérodiagnostic...

III. - Précautions d'emploi

La souche vaccinale pourrait provoquer chez le préparateur (en Institut de production) et chez le vaccinateur (par inoculation accidentelle ou par contact avec les muqueuses), une infection brucellique légère, voire une ophtalmoréaction allergique dans le cas d'infection antécédente.

Afin d'éviter ces risques (minimes), les manipulateurs doivent porter des lunettes, "l'instillateur" étant ganté.

Vis-à-vis de l'animal, l'instillation conjonctivale ne doit être ni sous-dosée ni sur-dosée pour éviter les risques d'erreur posologique par défaut (1 goutte = inefficacité) ou par excès (3 gouttes = nocivité sérologique). Cependant, le tableau 27 (cf. p.84-85- montre la sécurité de cette méthode, même en cas de surdosage.

La conjonctive doit être saine. Tout flacon à vaccin reconstitué comme tout compte-gouttes déjà utilisé doivent être soigneusement détruits. L'âge des animaux à la primovaccination et au rappel doit être soigneusement contrôlé.

CONCLUSION - CONSIDERATIONS GENERALES

CHOIX D'UNE NOUVELLE POLITIQUE VACCINALE

Cette étude nous a donc permis d'assister à la naissance d'une nouvelle méthode de vaccination antibrucellique, à partir d'un matériel préexistant (vaccin B 19), utilisé de façon originale. Les diverses expérimentations, tant en laboratoire que sur le terrain, ont montré l'efficacité de cette méthode, sa sûreté et ses facilités d'emploi.

Cependant, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, la Brucellose en France n'affecte plus guère en 1980 que 2,3 % des cheptels (chiffre qui était d'environ 40 % en 1970 et 15 % en 1976). Certaines zones approcheraient de l'état indemne, tandis que d'autres restent pour de longues années encore des foyers profondément atteints (comme l'Aveyron dans notre région). Or, quand une maladie contagieuse est progressivement éliminée de zones entières grâce aux mesures de prophylaxie, la vaccination systématique des populations, ne présente-t-elle pas plus d'inconvénients que d'avantages ? Pourquoi s'intéresser alors à de nouvelles méthodes vaccinales et quel peut être leur avenir ?

Pour répondre à cette question, il faut savoir si nous arriverons facilement à un assainissement très poussé, du fait d'une volonté très arrêtée d'accélérer ce processus par abattage des animaux et des troupeaux infectés (abattage massif qui explique en grande partie les progrès observés et réclame évidemment un financement considérable). Il est permis d'en douter à cause :

(1) d'une couverture vaccinale très différente selon les zones, en moyenne de 50 %, insuffisante pour interrompre la propagation de la maladie.

(2) d'un taux de recontamination élevé (qui serait de l'ordre de 50 %). Celui-ci résulte pour une part d'un assainissement insuffisamment rigoureux, et d'autre part, de la propagation de la maladie. Ce chiffre très élevé fait prévoir un "rebond" du taux d'infection dès relâchement des mesures de surveillance.

D'autre part, les faits le prouvent, on assiste ailleurs (U.S.A., Belgique) à des redémarrages de l'infection. Les Américains ont atteint depuis 15 ans un taux d'infection de l'ordre de 1 %. Or, après avoir ainsi obtenu un assainissement très poussé, de nouveaux cas apparaissent, non seulement dans les grands troupeaux où l'assainissement sanitaire devient très difficile, sinon impossible du fait de l'importance numérique des animaux, mais aussi dans des Etats tels que le Wisconsin, où les troupeaux sont de taille moyenne et où le niveau d'assainissement avait atteint celui des zones françaises les plus saines. C'est pourquoi les Américains ont remis en usage la vaccination des adultes et financé des recherches sur de nouvelles méthodes du diagnostic différentiel infection-vaccination et sur la vaccination avec des doses réduites de vaccin, utilisées par voie sous-cutanée ou conjonctivale.

Enfin, il faut tenir compte de l'étendue de la vaccination. Dans un troupeau, un seul animal non vacciné sert de relais à l'infection et de foyer de multiplication pour les *Brucella*. Tous les animaux d'un troupeau doivent être vaccinés pour que ce troupeau, dans son ensemble, puisse bénéficier de la protection vaccinale.

Ainsi, devant ces inconvénients et ces incertitudes, le vaccin B 19 dans sa forme moderne, la vaccination conjonctivale, offre beaucoup d'avantages. Il recouvre à peu près toutes les indications possibles en Brucellose bovine. En particulier, n'étant plus limité à une étroite fourchette d'âge, la vaccination s'adresse à des groupes entiers, au besoin à la totalité d'une population.

Nouvelle politique vaccinale

Afin d'éviter les problèmes qui pourraient apparaître lors de l'abandon de toute mesure vaccinale et afin de pallier les inconvénients représentés par les vaccinations actuelles autorisées, une nouvelle politique vaccinale a été proposée par PLOMMET (6). Cette politique est la suivante :

1. Ne retenir que le vaccin B 19, sous ses deux formes, classique sous-cutanée, moderne conjonctivale.

2. Maintenir la vaccination obligatoire des génisses (et renforcer la mise en oeuvre de cette obligation, rendue plus accessible par le procédé conjonctival) aussi longtemps que le taux régional d'infection par cheptel n'atteint pas 1 %. Cette règle générale pourra être modulée pour des taux supérieurs, jusqu'à 5 % quand les structures naturelles de l'élevage (densité du bétail, interpénétration des troupeaux) et les mesures de contrôle mises en place (Ring-test mensuel, contrôle du commerce et des pâturages collectifs) limitent le risque de recontamination. Ceci pourrait concerner aujourd'hui peut-être un quart ou un tiers de la France.

3. En contrepartie de la non-vaccination de zones progressivement de plus en plus étendues, autoriser ponctuellement la vaccination conjonctivale de toute la population, jeunes et adultes, dans des zones indemnes (non vaccinées) quand des risques graves de recontamination apparaissent. On garde ainsi en réserve une arme efficace pour reprendre en main une situation qui aurait échappé à la suite d'une évaluation minimisée des risques.

4. Autoriser ponctuellement la vaccination conjonctivale :

a) dans des effectifs menacés, pour renforcer l'immunité (en remplacement du vaccin 45/20) ;

b) sur les animaux de repeuplement, génisses et vaches, introduits dans les zones indemnes ;

c) dans les effectifs infectés de grande dimension (> 50 vaches) pour éviter la propagation progressive de l'infection à la totalité de l'effectif, rendant ainsi l'éradication sans abattage total à la fois possible et plus économique.

5. Créer un double marché de génisses, vaccinées et non vaccinées, par mention sur la carte verte.

Dans ces conditions, la vaccination antibrucellique pourrait connaître un regain d'intérêt et compléter avantageusement une politique d'abattage fort coûteuse, tout en lui assurant sa pleine efficacité.

VU : le Professeur de l'Ecole Vétérinaire

Rapporteur

Pr. CHANTAL

VU : le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

Pr. LAUTIE

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE - DIRECTION

VU : le Président de la Thèse

Pr. ARMENGAUD

VU et PERMIS D'IMPRIMER

Toulouse, le 19 - 5 - 1982

Le Président de

l'*Université Paul Sabatier*

UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER - TOULOUSE

P. D. BANCEL

B I B L I O G R A P H I E

1. FENSTERBANK R., PLOMMET M. - Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. IV. Comparison between two methods of vaccination. Ann. Rech. vét., 1979, 10, 131-139.

2. JOUBERT L., BERTRAND M., FERNEY J. - La prophylaxie de la brucellose bovine. Bull. Soc. Sci. vét., 1965, 67, 1-16.

3. PLOMMET M., PLOMMET A.M. - Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by conjunctival route. I. Protection demonstrated in guinea pigs. Ann. Rech. vét., 1975, 6, 345-356.

4. PLOMMET M., PLOMMET A.M. - *Ibidem.* II. Determination of the minimum dose leading to colonization of the regional lymph nodes of cattle. Ann. Rech. vét., 1976, 7, 1-8.

5. PLOMMET M., FENSTERBANK R. - *Ibidem.* III. Serological response and immunity in the pregnant cow. Ann. Rech. vét., 1976, 7, 9-23.

6. PLOMMET M. - Pour une politique de vaccination contre la brucellose bovine dans les années 80. Bull. Soc. Vét. Prat., 1980, 64 (8), 637-646.

7. RENOUX G., PLOMMET M., PHILIPPON A. - Microréactions d'agglutination et de fixation du complément pour le diagnostic des Brucelloses. Ann. Rech. vét., 1971, 2, 263-269.

8. RICHARD Y. - Les immunoglobulines brucelliques. Thèse Doct. Vét., Alfort, 1970.

9. SENHAGI A. - La vaccination antibrucellique chez les ruminants. Thèse Doct. Vét., Lyon, 1971.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma des trois méthodes expérimentales p. 12

Tableau 1 : Expérience A : Protocole - Protection - Infection p. 13

Figure 2 : Evolution des titres des agglutinines et des anticorps fixant le complément au cours de l'expérience A p. 14

Figure 3 : Evolution des titres des anticorps dans l'expérience B Moyenne des titres de 6 cobayes par lot p. 16

Tableau 2 : Expérience B : Protocole - Protection - Infection p. 17

Tableau 3 : Expérience C : Protocole - Protection - Infection p. 18

Tableau 4 : Résultats globaux des expériences A, B, C p. 19

Tableau 5 : Réponses sérologiques du bétail après vaccination p. 24

Tableau 6 : Réponse des veaux recevant des doses variables de suspension fraîche du vaccin B 19 sur la cornée droite p. 25

Tableau 7 : Réponse des veaux recevant des doses variées de vaccin lyophilisé B 19 sur la cornée droite p. 26

Tableau 8 : Données sérologiques, cliniques et bactériologiques après expérimentation p. 32

Tableau 9 : Nombre de génisses positives en sérologie après la primovaccination et la seconde vaccination p. 35

Figure 4 : Moyenne géométrique des taux d'agglutinines et d'anticorps fixant le complément dans le groupe B 6 mois après une vaccination sous-cutanée, dans le groupe C après une seconde vaccination par voie conjonctivale p. 36

Figure 5 : Moyenne géométrique des anticorps après la primovaccination conjonctivale dans le groupe D p. 37

Figure 6 : Moyenne géométrique des anticorps après la seconde vaccination conjonctivale dans le groupe D p. 37

Tableau 10 : Protection après l'épreuve p. 39

Figure 7 : Moyenne géométrique des agglutinines après primovaccination et rappel p. 45

Figure 8 : Proportion d'animaux positifs en sérologie après vaccination et rappel p. 46

Tableau 11 : Résultats cliniques et bactériologiques après inoculation dans le groupe témoin p. 47

Tableau 12 : Résultats cliniques et bactériologiques après inoculation dans le groupe de génisses recevant deux vaccinations conjonctivales p. 48

Tableau 13 : Résultats cliniques et bactériologiques après inoculation dans le groupe de génisses recevant une vaccination SC + C p. 49

Tableau 14 : Données bactériologiques à l'examen *post mortem* dans le groupe témoin p. 50

Tableau 15 : Données bactériologiques à l'examen *post mortem* dans le groupe de génisses recevant deux vaccinations conjonctivales p. 51

Tableau 16 : Données bactériologiques à l'examen *post mortem* dans le groupe de génisses recevant une vaccination SC + C p. 52

Tableau 17 : Comparaison de la protection à l'inoculation par deux méthodes de vaccination p. 53

Tableau 18 : Comparaison de la protection à l'inoculation par trois méthodes de vaccination (résultats de deux expérimentations successives) p. 53

Tableau 19 : Résultats cliniques - Domaine de Marcenat p. 61

Tableau 20 : Résultats bactériologiques - Domaine de Marcenat) p. 62

Tableau 21 : Résultats sérologiques - Domaine de Marcenat p. 62

Tableau 22 : Résultats sérologiques - Domaine de Marcenat p. 62

Tableau 23 : Résultats sérologiques - Domaine des Razats p. 66

Tableau 24 : Résultats cliniques et bactériologiques - Domaine de la Minière p. 68

Tableau 25 : Résultats sérologiques - Domaine de la Verrerie p. 71

Tableau 26 : Tableau récapitulatif p. 78

Tableau 27 : Résultats sérologiques suivant la dose vaccinale employée p. 84

Tableau 28 : Evolution du Ring-test chez les vaches adultes recevant la vaccination conjonctivale en cours de lactation p. 87

Tableau 29 : Réactions allergiques après vaccination au B 19 et rappel conjonctival (vaccination primaire C + C ou SC + C) p. 88

Tableau 30 : Modification de la température et de la production lactée après vaccination conjonctivale avec 5 x 10^9 *Brucella abortus* 19, le 5 février 1979 (moyenne des mesures sur 41 vaches) p. 89